

Spezies-spezifische und Zelltyp-spezifische Regulation von Toll-like Rezeptoren

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin der Universität
Regensburg**



**vorgelegt von
Monika Lichtinger
aus
Leiblfing
Juli 2007**

Promotionsgesuch eingereicht am: 16. Juli 2007

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD. Dr. Michael Rehli

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Günter Hauska

1. Gutachter: Prof. Dr. Charalampos Aslanidis

2. Gutachter: PD. Dr. Michael Rehli

3. Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2003 bis Juli 2007 in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg unter der Anleitung von PD Dr. Michael Rehli.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem und „Pattern-Recognition Receptors“ (PRRs)	1
1.2	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	2
1.2.1	Entdeckung und Struktur	2
1.2.2	Agonisten und Signalwege	3
1.2.2.1	TLRs und ihre Agonisten	3
1.2.2.2	Aktivierung von NF- κ B und IRFs (Interferon Regulatory Factors)	4
1.2.3	TLRs als Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität	6
1.3	Regulation der TLR Expression	7
1.3.1	Zelltyp-spezifische Expression von TLRs	7
1.3.2	Spezies-spezifische Expression der TLRs	9
1.4	Essentielle Transkriptionsfaktoren der Monopoese	11
1.4.1	PU.1 und seine Interaktionspartner	11
1.4.2	ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein)	13
2.	Ziele	16
3.	Material und Methoden	17
3.1	Materialien und Geräte	17
3.1.1	Geräte	17
3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel	17
3.1.3	Chemikalien	18
3.1.4	Antikörper	18
3.1.5	Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits	18
3.1.6	Vektoren	19
3.1.7	Oligonukleotide	20
3.1.8	Bakterienstämme	22

3.1.9	Zelllinien.....	23
3.2	Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1	Bakterienkultur	23
3.2.2	Präparation von kompetenten <i>E. Coli</i>	24
3.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	24
3.2.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	25
3.2.5	Mutagenese, Klonierung und Analyse von DNA	25
3.2.5.1	Gelelektrophorese für DNA	25
3.2.5.2	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	26
3.2.5.3	Restriktionsverdau.....	26
3.2.5.4	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	26
3.2.5.5	Sequenzierung von Plasmid-DNA	27
3.2.6	Präparation und Analyse von RNA	27
3.2.6.1	RNA Extraktion mit Guanidin-Phenol-Chloroform.....	27
3.2.6.2	Formaldehyd-Agarose-Gel für RNA.....	29
3.2.7	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	29
3.2.7.1	Reverse Transkription (RT-PCR).....	30
3.2.7.2	Real-time-PCR	30
3.2.7.3	PCR-basierte gerichtete Mutagenese.....	31
3.2.7.4	Transkriptionsstart-Analyse durch 5'-RLM-RACE-PCR	32
3.2.8	<i>In vivo</i> Footprinting.....	33
3.2.8.1	DNA-Präparation von Dimethylsulfat (DMS) und Piperidin behandelten Zellen	33
3.2.8.2	„Ligation-mediated“ PCR (LM-PCR)	35
3.2.9	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	37
3.3	Zellbiologische Methoden	40
3.3.1	Kultur der Zelllinien	40
3.3.1.1	Kulturbedingungen und Passagierung.....	40
3.3.1.2	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	41
3.3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
3.3.1.4	Nachweis von Mykoplasmen	42
3.3.2	Humane Monozytenisolierung durch Gegenstromelutriation	42
3.3.3	Kultivierung von humanen Monozyten	43
3.3.4	Gewinnung und Kultivierung von murinen Knochenmarkmakrophagen..	44

3.3.5	Gewinnung von Darmepithelzellen	44
3.3.5.1	Humane Darmepithelzellen	44
3.3.5.2	Murine Epithelzellen	45
3.3.6	Transiente Transfektion von Zelllinien	45
3.3.6.1	Transfektion mit Lipofectamine.....	45
3.3.6.2	Transfektion mit Effectene.....	45
3.3.6.3	Luziferase Reporter Assay	46
3.4	Proteinchemische Methoden.....	46
3.4.1	Anleitung zur Kernextraktion.....	46
3.4.2	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	47
4.	Ergebnisse	50
4.1	Toll-like Rezeptor 4 (<i>TLR4</i>) mRNA Expression und Spleißverhalten in Mensch und Maus	50
4.1.1	Spleißen als Regulationsmechanismus der <i>TLR4</i> Expression.....	50
4.1.2	Spezies-spezifische <i>TLR4</i> Regulation in alternativ aktivierten Makrophagen	52
4.1.3	Spezies-spezifische <i>TLR4</i> Regulation in epithelialen Zelllinien	53
4.2	Transkriptionelle Regulation des <i>TLR4</i> Gens auf Promotorebene	55
4.2.1	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte (TSSs) des <i>TLR4</i> Promotors: Definition eines alternativen Promotors in nicht-myeloischen Zellen.....	56
4.2.2	Sequenzvergleich der minimalen <i>TLR4</i> Promotoren.....	58
4.2.3	Identifizierung wichtiger <i>cis</i> -Elemente des <i>TLR4</i> Promotors im Reportersystem	60
4.2.4	Analyse der <i>TLR4</i> Sequenzunterschiede zwischen Mensch und Maus mittels chimären Reporterkonstrukten.....	62
4.2.5	Bestimmung exogener TSSs der <i>TLR4</i> Reporterkonstrukte	64
4.2.6	Protein-DNA Interaktion am <i>TLR4</i> Promoter <i>in vivo</i>	65
4.2.6.1	Vergleich myeloischer Zellen von Mensch und Maus.....	66
4.2.6.2	Vergleich myeloischer und nicht-myeloischer Zellen der Maus	69
4.2.7	Analyse des proximalen <i>Tlr4</i> Promotors	70

4.2.7.1 Einfluss des Makrophagen-spezifischen Transkriptionsfaktors PU.1	71
4.2.7.2 ICSBP als ein Regulator der TLR Expression	73
4.2.8 Analyse des alternativen, distalen Promotors und Funktion der AP1/E-Box.....	75
4.2.8.1 Mutationsanalysen.....	75
4.2.8.2 Identifikation von Transkriptionsfaktoren <i>in vitro</i>	77
4.2.8.3 Überexpressionsanalysen	80
4.2.9 Quantifizierung von Transkriptionsfaktoren am <i>Tlr4</i> Promoter	82
4.3 Analysen der Chromatinstruktur	85
4.4 <i>Tlr4</i> Regulation in PUER Zellen	87
4.4.1 <i>Tlr4</i> Expression	88
4.4.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte nach Stimulation	89
4.4.3 Transkriptionsfaktor-Bindung und Histonmodifikationen am <i>Tlr4</i> Promoter in PUER Zellen.....	90
4.4.4 Abhängigkeit der TSS bei anderen PU.1-induzierten Genen.....	92
4.5 Translationale Regulation.....	93
4.6 TCR Mäuse: Ein humanisiertes TLR4 Mausmodell	96
4.6.1 Untersuchung des <i>TLR4</i> Expressionsmusters.....	97
4.6.2 Expressionsanalyse der myeloischen und nicht-myeloischen Zellen im Vergleich von Mensch und Maus	98
4.7 Expressionsanalyse der <i>TLR5</i> mRNA bei Mensch und Maus	100
4.8 Regulation des murinen <i>Tlr9</i> Promotors	102
5. Diskussion.....	106
5.1 <i>TLR4</i> Expression in humanen und murinen Makrophagen	106
5.2 Spezies-spezifische Transkription der <i>TLR4</i> Gene in nicht-myeloischen Zellen	109
5.3 Einfluss von PU.1 und Icsbp auf die Regulation des <i>Tlr4</i> Promotors.....	111
5.3.1 PU.1 und der Transkriptionsinitiationskomplex.....	111
5.3.2 Icsbp und der murine <i>Tlr4</i> Promotor	113
5.4 Posttranskriptionelle Kontrolle der <i>TLR4</i> Regulation	114
5.5 TLR4 in epithelialen Zellen	117

5.6	Zusammenfassung der Regulationsmechanismen von <i>TLR4</i> in Maus und Mensch	120
5.7	Regulation des <i>TLR5</i> Gens in Maus und Mensch.....	121
5.8	Regulation des <i>TLR9</i> Gens in Maus und Mensch.....	122
6.	Ausblick.....	126
7.	Zusammenfassung	127
8.	Literaturverzeichnis.....	129
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Urzeitliches Immunabwehrsystem bei Insekten und Wirbeltieren	2
Abbildung 1-2. TLRs und ihre identifizierten Agonisten	3
Abbildung 1-3. TLR Signalkaskade.....	5
Abbildung 1-4. Regulation der T _H - Zelldifferenzierung durch TLRs auf APCs.....	7
Abbildung 1-5. Ets-Bindedomäne	11
Abbildung 4-1. Analyse der mRNA des humanen bzw. murinen <i>TLR4</i>	51
Abbildung 4-2. Interleukin 4-abhängige mRNA Expression von <i>TLR2</i> und <i>TLR4</i>	53
Abbildung 4-3. Regulation der <i>TLR4</i> mRNA nach Stimulation mit Zytokinen und LPS in IEC	54
Abbildung 4-4. Übersichtsdarstellung der <i>TLR4</i> Promotoren in Mensch und Maus	56
Abbildung 4-5. TSS-Analyse des <i>TLR4</i> Promotors bei Mensch und Maus	57
Abbildung 4-6. Alignment des <i>TLR4</i> Promotors von Mensch, Schimpanse, Rind, Hund, Ratte und Maus	59
Abbildung 4-7. Reporteranalysen des murinen und humanen <i>TLR4</i> Promotors in RAW264.7.....	61
Abbildung 4-8. Reporteranalyse von chimären <i>TLR4</i> Konstrukten in RAW264.7 Makrophagen	63
Abbildung 4-9. Exogene TSS-Analysen der <i>TLR4</i> Reporterkonstrukte mittels 5'-RACE-PCR	65
Abbildung 4-10. DMS <i>In vivo</i> Footprint des humanen <i>TLR4</i> Promotors in Monozyten und Makrophagen	67
Abbildung 4-11. DMS <i>in vivo</i> Footprint des <i>TLR4</i> Promotors in der monozytären Zelllinie THP1 ..	68
Abbildung 4-12. <i>In vivo</i> Footprint des murinen <i>Tlr4</i> Promotors in BMM	69
Abbildung 4-13. DMS <i>In vivo</i> Footprint des <i>Tlr4</i> Promotors in unterschiedlichen Zelltypen	70
Abbildung 4-14. Bindung von PU.1 am <i>Tlr4</i> Promotor	72
Abbildung 4-15. Quantitative Real-time <i>Tlr4</i> Expression in Icsbp K.o. Mäusen	73
Abbildung 4-16. Real-time quantitative <i>Tlr3</i> Expression in Icsbp K.o. Mäusen	74
Abbildung 4-17. Luziferase-Aktivität des alternativen <i>Tlr4</i> Promotors in RAW264.7 und NIH3T3 ..	76
Abbildung 4-18. Luziferase-Assay des alternativen, distalen Promotors.....	76
Abbildung 4-19. EMSA der AP1/E-Box (A/E) mit NIH3T3 Kernextrakt.....	78
Abbildung 4-20. Supershift der AP1/E-Box (A/E) mit RAW264.7 Kernextrakt.....	80
Abbildung 4-21. Kotransfektions-Reporteranalysen in RAW264.7 und NIH3T3 Zellen.....	82
Abbildung 4-22. ChIP Analyse des murinen <i>Tlr4</i> Promotors	84
Abbildung 4-23. ChIP-Analysen der Histonmodifikationen am <i>Tlr4</i> Promotor	86
Abbildung 4-24. PUER Vektorkonstrukt	88
Abbildung 4-25. RT-Analyse der <i>Tlr4</i> Expression in PUER Zellen	88
Abbildung 4-26. Kinetik der TSS des <i>Tlr4</i> Promotors nach PU.1 Aktivierung in PUER Zellen.....	89
Abbildung 4-27. ChIP-Kinetik der PUER Zellen nach OHT-Aktivierung	91
Abbildung 4-28. TSS-Analyse PU.1-regulierter Gene in PUER Zellen.....	92
Abbildung 4-29. Luziferase-Assay zur Bestimmung der Translationseffizienz	93
Abbildung 4-30. <i>Out-of-frame</i> ATG-Mutationen im murinen <i>Tlr4</i> Reporterkonstrukt	95
Abbildung 4-31. Effekte der <i>out-of-frame</i> ATGs in Mensch und Maus	96
Abbildung 4-32. <i>TLR4</i> Spleißvarianten in den TCR Mäusen im Vergleich zu Mensch und Maus...	97
Abbildung 4-33. <i>TLR4</i> TSS-Analysen der myeloischen und nicht-myeloischen Zellen der TCR-Mäuse.....	98
Abbildung 4-34. Quantitativer Vergleich der <i>TLR4</i> mRNA in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen.....	99
Abbildung 4-35. 5'-RACE-PCR mit erhöhter Zyklenzahl zum Nachweis von <i>TLR4</i>	100
Abbildung 4-36. <i>TLR5</i> Promotor Alignment von Mensch und Maus	101
Abbildung 4-37. <i>TLR5</i> mRNA Expression in Mensch und Maus	102
Abbildung 4-38. Sequenz-Alignment der <i>TLR9</i> Promotoren von Mensch, Schimpanse, Hund und Maus	103
Abbildung 4-39. EMSA des kombinierten IRF/Ets-Motivs im murinen <i>Tlr9</i> und <i>Tlr4</i> Promotor	104
Abbildung 4-40. <i>Tlr9</i> mRNA Expression in Wildtyp und Icsbp K.o. Mäusen.....	105
Abbildung 5-1. Regulation des <i>TLR4</i> in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen von Maus und Mensch.....	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1. Interferon Konsensussequenzen	15
Tabelle 3-1. DNA-Agarosegele	26
Tabelle 3-2. RNA-Agarosegele	29
Tabelle 3-3. Affinität von Protein A/G	39
Tabelle 3-4. Zellkulturbedingungen	40
Tabelle 3-5. Elutrationsschema	42
Tabelle 3-6. Polyacrylamidgel 15 ml/Gel	49
Tabelle 3-7. Pipettierschema für EMSA	49
Tabelle 4-1. Kompetitor-Sequenzen für EMSA	78

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem und „Pattern-Recognition Receptors“ (PRRs)

Das menschliche Immunsystem hat sich zum Schutz vor Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen entwickelt und wird grundsätzlich in zwei Abwehrsysteme eingeteilt, das angeborene und das erworbene Immunsystem. Die angeborene Immunität wirkt als erste, unspezifische Abwehr, bei der hauptsächlich Makrophagen und Neutrophile durch ein begrenztes Spektrum an Rezeptoren, den sogenannten „Pattern-Recognition Receptors“ (PRRs), pathogene Erreger und mikrobielle Substanzen erkennen, durch diese aktiviert werden und sie durch Phagozytose und die Produktion von antimikrobiellen Substanzen eliminieren (Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. 2002). Die zweite Abwehrfront ist die erworbene Immunität, die sich durch die Spezifität klonaler T- und B-Zellen und ihrer Gedächtnisfunktion auszeichnet.

Während die B- und T-Zell-Rezeptoren der erworbenen Immunabwehr durch somatische Rekombinationen ein nahezu unendliches Repertoire an Antigenen erkennen, sind die PRRs der angeborenen Immunabwehr limitiert und bereits in der Keimbahn festgelegt. Im Allgemeinen erkennen PRRs hochkonservierte lebenswichtige Bestandteile von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, DNA- und RNA-Viren, Pilzen und Protozoen, die als sogenannte „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden.

PRRs lassen sich grob in zwei Klassen unterteilen. Die erste Klasse ist vor allem an der Einleitung der Phagozytose beteiligt und umfasst einige C-Typ Lektine, wie z.B. Dectin-1 oder DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-Grabbing Nonintegrin), Scavenger Rezeptoren und humorale Komponenten wie das MBL (Mannan-Binding-Lectin). Die zweite Klasse ist in erster Linie für die Sezernierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine verantwortlich. Hierzu gehören eine Reihe von zytoplasmatischen PRRs, die sich durch eine CARD (Caspase-Recruitment Domain)-Domäne auszeichnen (Meylan, E. and Tschopp, J. 2006) und die sogenannten Toll-like Rezeptoren (Beutler, B. 2004, Underhill, D. M. 2003).

1.2 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

1.2.1 Entdeckung und Struktur

Eine sehr wichtige Familie dieser PRRs des angeborenen Immunsystems ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR). Ihre Entdeckung geht auf die Beobachtung der immunstimulatorischen Wirkung des Proteins Toll in *Drosophila* zurück. Ursprünglich wurde Toll mit der dorsoventral Entwicklung bei *Drosophila* in Verbindung gebracht (Anderson, K. V. et al. 1985), Lemaître et al. konnten jedoch im Jahre 1996 zeigen, dass Toll auch an der effizienten Abwehr des Pilzes *Aspergillus niger* beteiligt ist (Lemaître, B. et al. 1996). Der Signalweg von *Drosophila* Toll entspricht der Signalkaskade des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) bei Wirbeltieren und führt zur Kerntranslokation von NF- κ B (Nuclear Factor κ B). Die *Drosophila* Proteine Dorsal und sein Inhibitor Cactus sind homolog zu NF- κ B und I κ B (Inhibitor of NF- κ B) (Abbildung 1-1).

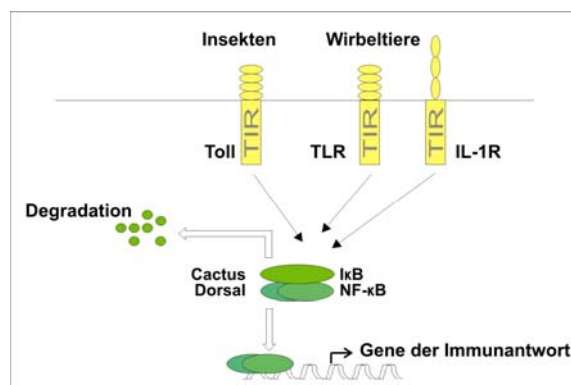


Abbildung 1-1. Urzeitliches Immunabwehrsystem bei Insekten und Wirbeltieren

Eine hochkonservierte Signalkaskade führt über die Rezeptoren Toll (*Drosophila*), TLR und IL-1R (Wirbeltiere) zur Degradation von Cactus/I κ B, Freisetzung von Dorsal/NF- κ B und Transkription inflammatorischer Zielgene. Die zytoplasmatische TIR (Toll/IL-1R)-Domäne der Rezeptoren ist ebenfalls hochkonserviert. Die Ektodomäne der Toll-Rezeptoren ist gekennzeichnet durch LRRs (Leucin-Rich Repeats) im Gegensatz zu drei extrazellulären Immunglobulinen des IL-1R. Abbildung modifiziert nach (Medzhitov, R. et al. 1997)

Aufgrund der hohen Konservierung der zytoplasmatischen Domäne von Toll, IL-1R und den TLRs wird diese als TIR (Toll-IL-1R)-Domäne bezeichnet. Im Gegensatz zum IL-1R, der sich durch drei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen auszeichnet, erkennen TLRs ihre Agonisten durch die für sie typischen LRRs (Leucine-Rich Repeats) der extrazellulären Domäne.

Bisher sind 13 TLRs, davon 10 humane und 12 murine TLRs, bekannt, die bei der Erkennung bakterieller und viraler Komponenten aktiviert werden.

1.2.2 Agonisten und Signalwege

1.2.2.1 TLRs und ihre Agonisten

Abhängig von der Struktur der PAMPs können TLRs in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 1-2). TLR1, 2, 4 und 6 erkennen Lipide und sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Dabei bildet TLR2 Homodimere oder Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 und wird durch Bestandteile von gram-positiven Bakterien (Peptidoglykane, Lipopeptide und Lipoproteine), Mykoplasmen (Lipopeptide) oder Pilzen (Zymosan) aktiviert.

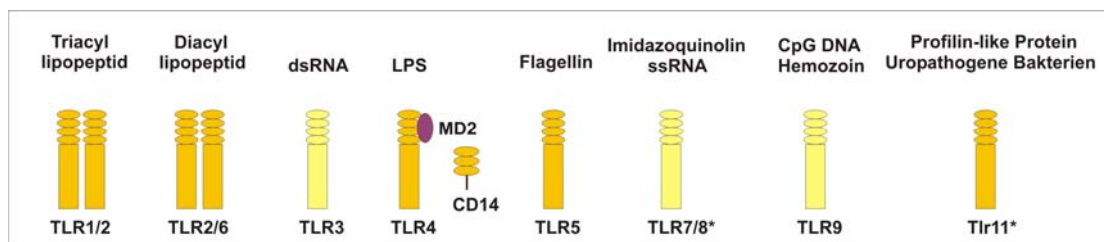


Abbildung 1-2. TLRs und ihre identifizierten Agonisten

TLR2 bildet entweder Homo- oder Heterodimere mit TLR1 oder TLR6. Eine Signaltransduktion durch TLR4 ist abhängig von dem assoziierten Molekül MD-2 und dem Korezeptor CD14. Agonisten für den murinen TLR8* sind nicht bekannt und Tlr11* wurde nur in der Maus nachgewiesen. Die Rezeptoren TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11 sind auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, 7/8 und 9 in Endosomen lokalisiert sind. Nicht abgebildet sind der humane TLR10, der vermutlich mit TLR1 und TLR2 dimerisiert (Kawai, T. and Akira, S. 2007) und in der Maus nur als Pseudogen vorkommt (Beutler, B. et al. 2003). Abbildung nach (Kawai, T. and Akira, S. 2006)

Der bekannteste und zum *Drosophila* Toll Rezeptor orthologe TLR4 wurde 1998 von Poltorak et al. als Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) identifiziert (Poltorak, A. et al. 1998). Bei zwei Mausstämmen, die schon lange für ihre LPS-Hyposensitivität und Immundefizienz bekannt waren, wurden Mutationen im *Tlr4* Gen (C3H/HeJ: Punktmutation und C57BL/10ScCr: Deletion) für den Defekt verantwortlich gemacht. LPS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Ein Jahr später wurde MD-2 entdeckt, das mit TLR4 assoziiert ist und eine weitere, unentbehrliche Komponente bei der Erkennung von LPS und die TLR4 Signaltransduktion darstellt (Shimazu, R. et al. 1999). Für die

empfindliche Erkennung von LPS sind zwei weitere Proteine nötig: LBP (LPS-Bindeprotein) und CD14. LBP stellt eine Lipid-Transferase dar, die LPS aus der äußeren Membran der Bakterien zu CD14 transportiert. Dabei wird CD14 in zwei Formen exprimiert, einer membranständigen (mCD14) und einer löslichen, sezernierten Form (sCD14) (Schumann, R. R. et al. 1990, Wright, S. D. et al. 1990). Jedoch scheint CD14 nicht für die Signaltransduktion selbst nötig zu sein, sondern wirkt als Verstärker des LPS-induzierten Signals. Außer LPS sind auch pflanzliches Taxol und Virenbestandteile (Respiratory Syncytial Virus (RSV): Fusion Protein; Maus Mammary-Tumor Virus (MMTV): Envelope Protein) als TLR4 Agonisten bekannt.

Die Rezeptoren TLR5 und der murine TLR11 sind ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen bakterielle Proteine, Flagellin (TLR5) bzw. Profilin-ähnliche Proteine des parasitischen Protozoa *Toxoplasma gondii* (TLR11) (Zhang, D. et al. 2004).

Eine weitere Gruppe, zu der TLR3, 7/8 und 9 gehören, ist intrazellulär lokalisiert und erkennt Nukleinsäurestrukturen, die mehr oder weniger spezifisch für Viren und Bakterien sind. Als TLR3 Agonist wurde doppelsträngige RNA (dsRNA) nachgewiesen, die während der Replikation vieler Viren auftritt. TLR7 und der humane TLR8 erkennen Imidazoquinolin-ähnliche Moleküle oder einzelsträngige RNA (ssRNA), während die Funktion des murinen Tlr8 unbekannt ist (Kawai, T. and Akira, S. 2007). TLR9 ist ein Rezeptor für CpG enthaltende DNA aus Bakterien und Viren sowie für Hemozoin, ein Produkt des Malaria Parasiten (*Plasmodium spp.*). Die intrazelluläre Lokalisation dieser TLRs erleichtert wahrscheinlich die Unterscheidung zwischen fremder und eigener DNA.

Für die murinen Tlr12 und Tlr13 sowie für den humanen TLR10 sind bisher keine Agonisten bekannt.

1.2.2.2 Aktivierung von NF- κ B und IRFs (Interferon Regulatory Factors)

Sobald ein Agonist an den passenden Rezeptor gebunden hat werden Adaptormoleküle an den zytoplasmatischen Teil der TLRs rekrutiert, die ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM). In der anschließenden Signalkaskade erfolgt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP1, IRF3 und IRF7 (Abbildung 1-3).

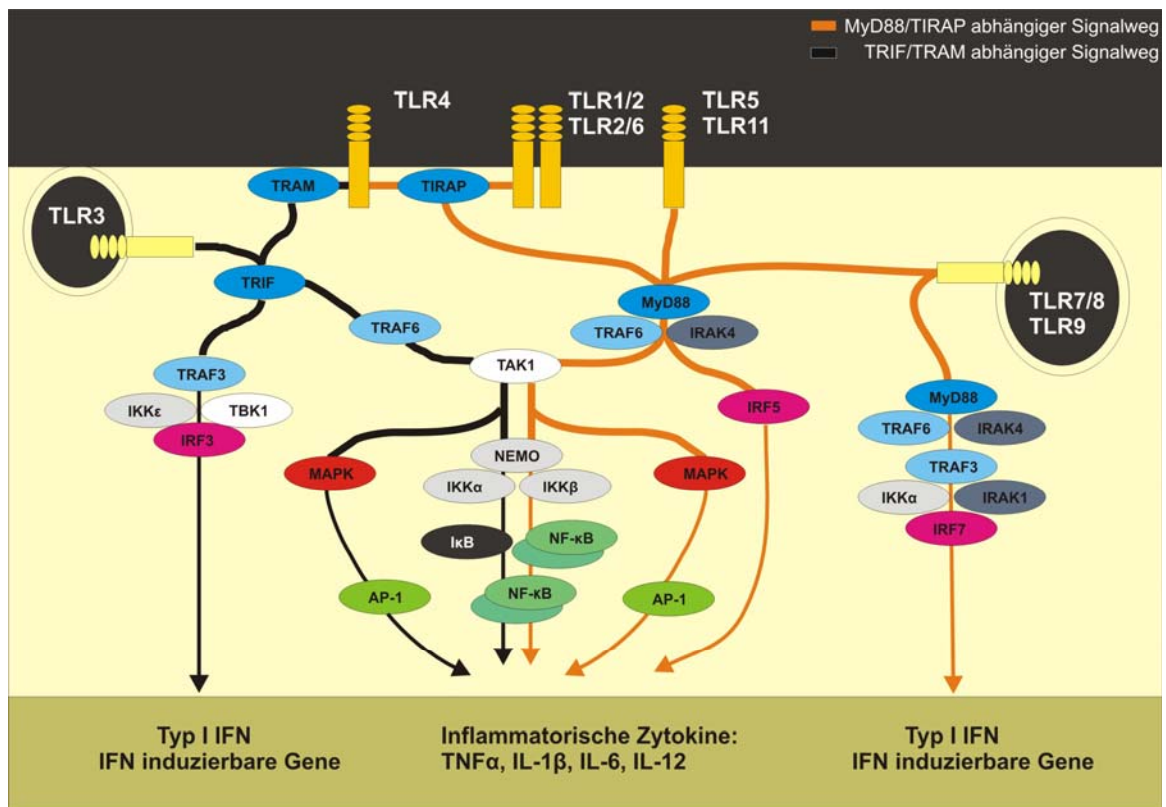


Abbildung 1-3. TLR Signalkaskade

Nach Stimulation der TLRs werden Adaptormoleküle (MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM) rekrutiert. Die Freisetzung von NF-κB und die Aktivierung von IRFs erfolgt entweder über den MyD88/TIRAP-abhängigen oder TRIF/TRAM-abhängigen Signalweg unter Beteiligung bekannter Komponenten (IRAKs, TRAFs). Die aktivierten Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression inflammatorischer Gene. Abbildung nach (Kawai, T. and Akira, S. 2007)

Der Adaptor MyD88 (Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88) ist in der Aktivierung aller TLRs außer TLR3 involviert und führt unter Beteiligung anderer Regulatorproteine (IRAKs, TRAFs) zur Inaktivierung von IκB und zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, AP1 (c-fos/c-jun), wird über den MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase: p38, JNK und Erk)-Weg aktiviert. NF-κB und AP1 induzieren die Expression von inflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IL-1β, IL-6, und IL-12) und Adhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine). Typ I Interferone (mehrere IFNαs und IFNβ) können TRIF/TRAM-abhängig durch die Aktivierung von IRF3 (TLR3 und TLR4) oder MyD88-abhängig durch die Aktivierung von IRF7 (TLR7/8 und TLR9) induziert werden und autokrin weitere Mediatoren aktivieren. Zwei weitere IRF-Faktoren, IRF1 und IRF5, werden durch MyD88 aktiviert und sind jeweils an

der Transkription von Typ I Interferonen (IRF1) oder inflammatorischen Zytokinen (IRF5) beteiligt (Colonna, M. 2007).

1.2.3 TLRs als Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität

Beobachtungen, die auf einen Einfluss aktivierter TLRs auf die erworbene Immunität hinweisen, wurden schon lange vor der Entdeckung der TLRs gemacht. Bei Impfungen wurde die Immunogenität eines Antigens durch die gleichzeitige Applikation mikrobieller Bestandteile merklich verbessert. Dieser Effekt wurde später auch bekannt als Freund's Adjuvant, welches getöte Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*), Toxin (*Bordetella pertussis*) und weitere bakterielle Bestandteile wie LPS und CpG-reiche DNA enthält.

Die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Phänomens wurde erst mit der Entdeckung der TLRs erkannt. Die Aktivierung von naïven T-Zellen kann nämlich nur erfolgen, wenn die TCR (T-Cell Receptor)-MHC (Major Histocompatibility Complex)/Peptid-Interaktion mit einem zweiten kostimulatorischen Signal gekoppelt ist, das durch die Interaktion von CD28 auf den T-Zellen und CD80/CD86 (B7-Familie) auf den APCs (Antigen Presenting Cells) zustandekommt (Liu, Y. and Janeway, C. A., Jr. 1992). Dendritische Zellen, die professionelsten APCs, exprimieren im unreifen Zustand nur geringe Spiegel an MHC und kostimulatorischen Molekülen. Erst bei einer TLR-abhängigen Aktivierung durch pathogene Mikroorganismen werden MHC-Moleküle und Korezeptoren der B7-Familie hochreguliert (Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998). Dieser Mechanismus soll gewährleisten, dass ausschließlich pathogenspezifische T-Zellen aktiviert werden. Die Ausschüttung von Zytokinen der Effektorzellen des angeborenen Immunsystems beeinflusst in zweierlei Hinsicht die erworbene Immunantwort (Abbildung 1-4). Einerseits sind die inflammatorischen Zytokine, hauptsächlich IL-6, wichtig für die effiziente Aktivierung der naïven T-Zellen, damit sich diese den supprimierenden Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen (CD4⁺, CD25⁺) entziehen können (Pasare, C. and Medzhitov, R. 2003). Andererseits bestimmt das Zytokinmilieu die Art der spezifischen T-Zellantwort. Durch die charakteristische Produktion von IL-12 favorisieren TLRs eine T_H1-Immunantwort. Die T_H1-Zellen verstärken die Sekretion von IFN γ , welches wiederum die Entwicklung von klassisch aktivierten

Makrophagen fördert, und aktivieren zytotoxische T-Zellen und B-Zellen. Gleichzeitig wird eine T_H2 -Antwort unterdrückt (Dabbagh, K. and Lewis, D. B. 2003).

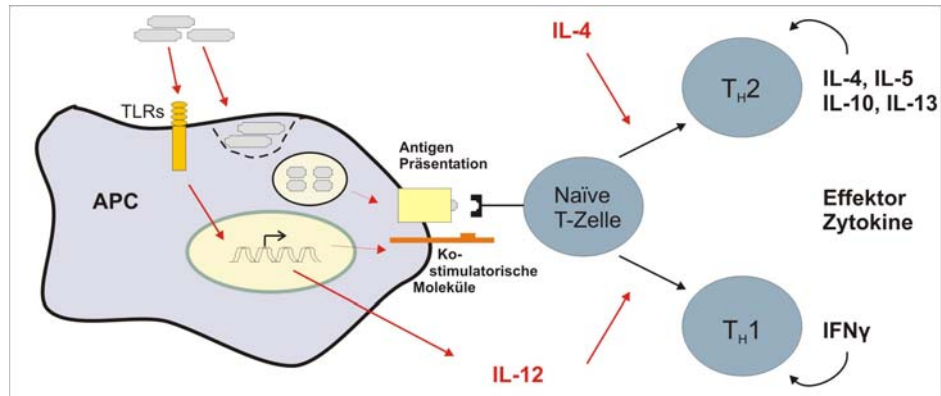


Abbildung 1-4. Regulation der T_H -Zelldifferenzierung durch TLRs auf APCs

Aufgenommene Pathogene werden prozessiert und den T-Zellen als MHC-Peptid-Komplex präsentiert. Für eine effektive Antigen-spezifische T-Zell Expansion sind kostimulatorische Moleküle nötig, die ebenfalls durch die TLR-Aktivierung hochreguliert werden. Das Zytokinmilieu ist richtungsweisend für die Differenzierung der naïven T-Zellen in entweder T_H1 - oder T_H2 -Zellen. TLRs induzieren durch die Produktion von IL-12 eine T_H1 -Entwicklung. Abbildung nach (Akira, S. et al. 2001)

1.3 Regulation der TLR Expression

1.3.1 Zelltyp-spezifische Expression von TLRs

In einer Studie zur gewebespezifischen Expression von TLRs wurde gezeigt, dass in allen untersuchten Geweben des Menschen mindestens ein TLR exprimiert wird. In der Milz und in PBLs (Peripheral Blood Leukocytes) wurden alle zehn TLR Transkripte nachgewiesen und Analysen von fraktionierten Leukozyten zeigten, dass die größte Vielfalt der TLR Expression in Phagozyten zu finden ist (Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. 2002). Dabei exprimieren nicht alle Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten) gleichzeitig die vollständige TLR-Familie, sondern sie ergänzen sich gegenseitig durch die Expression überschneidender Rezeptorkombinationen (Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2004). Am Besten untersucht sind Makrophagen und dendritische Zellen, von denen wiederum Untergruppen bekannt sind, die unterschiedliche TLR Expressionsmuster aufweisen. Ein Beispiel dafür sind $CD11c^+$ dendritische Zellen in der Lamina

Propria des Darms, die im Gegensatz zu anderen dendritischen Zellen *TLR5* aber nicht *TLR4* exprimieren. Möglicherweise ist dies ein gewebespezifischer Mechanismus zur Unterscheidung pathogener Keime und meist unbegeiselter, kommensaler Bakterien im Darm (Uematsu, S. et al. 2006). Plasmazytische dendritische Zellen (pDCs), die auch als Typ I IFN-produzierende Zellen bekannt sind, exprimieren im Gegensatz zu konventionellen dendritischen Zellen *TLR7* und *TLR9* konstitutiv (Hemmi, H. et al. 2003, Uematsu, S. and Akira, S. 2007). Dies ermöglicht den pDCs auf eine Vireninfektion schnellstmöglich mit einer antiviralen Typ I IFN-Antwort zu reagieren.

Neben Makrophagen und dendritischen Zellen gehören auch Epithelzellen, die Pathogene als erste Barriere überwinden müssen, zu den TLR exprimierenden Zellen der angeborenen Immunität. Im Allgemeinen ist über die Funktion und Expression von TLRs in diesen Zellen nur wenig bekannt. Am meisten weiss man über die Expression von *TLR4* und *TLR5* (Backhed, F. and Hornef, M. 2003, Gewirtz, A. T. et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass Epithelzellen unter sterilen Bedingungen, z.B. in der Blase, *TLR4* zur Abwehr von invasiven Mikroben exprimieren. Anders ist die Situation bei Epithelien, die zum Schutz vor Pathogenen von einer normalen Bakterienflora umgeben sind, z.B. der Haut oder im Magen-Darm-Trakt. Diese normalerweise ungefährlichen Mikroorganismen enthalten aber trotzdem potentiell TLR-aktivierende Komponenten. Lange Zeit wurde angenommen, dass Epithelzellen weder *TLR4* noch *CD14* exprimieren. Neuere Untersuchungen haben jedoch auch geringe Mengen an TLR4, z.B. in intestinalen Epithelzellen (IEC), nachgewiesen (Bocker, U. et al. 2003). Trotzdem scheinen Epithelzellen gegenüber LPS-Aktivierung resistent zu sein (Backhed, F. et al. 2003). Diese Beobachtung könnte an der fehlenden Expression der Kofaktoren *CD14* oder *MD2* liegen (Abreu, M. T. et al. 2001). Hornef et al. postulierten eine Makrophagen-ähnliche Toleranzinduktion durch eine wiederholte LPS-Stimulierung, die auch bei IECs gezeigt werden konnte. Außerdem wurde in IECs die Kolokalisation von TLR4 mit dem Golgi Apparat nachgewiesen, so dass sich Epithelzellen durch die fehlende TLR4 Oberflächenexpression der Aktivierung durch kommensale Bakterien entziehen können (Hornef, M. W. et al. 2002).

Der Flagellin-Rezeptor *TLR5* wurde zwar hauptsächlich in Epithelzellen nachgewiesen, ist aber nur auf der basolateralen Seite der Epithelschicht

lokalisiert und kommt daher ausschließlich mit invasiven Mikroben in Kontakt (Gewirtz, A. T. et al. 2001).

1.3.2 Spezies-spezifische Expression der TLRs

Unterschiede in der TLR Expression sind nicht nur bei verschiedenen Zelltypen bekannt, sondern auch im Vergleich von Mensch und Maus prominent (Rehli, M. 2002). In unserer Arbeitsgruppe wurde die differentielle Expression von *TLR2* und *TLR3* bereits gut untersucht. Beim Menschen ist *TLR2* mRNA überwiegend in den myeloischen Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten) exprimiert und wird in Monozyten durch Adhärenz, aber nicht durch die Stimulation mit LPS hochreguliert (Haehnel, V. et al. 2002, Rock, F. L. et al. 1998). Im Gegensatz zum Menschen wurde *Tlr2* mRNA in der Maus in T-Zellen detektiert. In murinen Monozyten und Makrophagen ist das *Tlr2* Transkript nahezu nicht nachweisbar, wird jedoch durch LPS-Stimulierung stark hochreguliert. Da die Promotorsequenzen nicht konserviert sind, werden beide *TLR2* Gene wahrscheinlich durch verschiedene Elemente reguliert. In der Maus wurden zwei nicht-konservierte Motive, NF- κ B und STAT5, mit der LPS-vermittelten Hochregulation in Verbindung gebracht (Musikacharoen, T. et al. 2001). Spezifische Enhancer- und Silencer-Elemente könnten für die Zelltyp-abhängige Expression verantwortlich sein (Haehnel, V. et al. 2002).

Promotoranalysen der *TLR3* Gene offenbarten ebenfalls evolutionäre Veränderungen in den regulatorischen Regionen beider Spezies (Heinz, S. et al. 2003). Während in humanen myeloischen Zellen das Transkript ausschließlich in dendritischen Zellen nachgewiesen wurde, exprimierten auch murine Makrophagen *Tlr3* mRNA. Nach LPS-Stimulierung wurde der *TLR3* mRNA Spiegel in Mausmakrophagen, nicht aber in humanen dendritischen Zellen, stark erhöht (Muzio, M. et al. 2000, Visintin, A. et al. 2001). Dieser Effekt in der Maus kommt durch die LPS-induzierte autokrine IFN β Produktion zustande, während in humanen Zellen die Induktion von *TLR3* durch LPS unterdrückt wird (Heinz, S. et al. 2003). Vermutlich sind transkriptionsaktivierende Elemente des humanen Promotors spezifisch für dendritische Zellen, während der murine Promotor Makrophagen-spezifische Regulatorbereiche enthält. Tatsächlich wurden nur im murinen *Tlr3* Gen mehrere Ets-Motive identifiziert, die Erkennungssequenzen für

den myeloischen und B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor PU.1 darstellen (Rehli, M. 2002).

Obwohl die Promotoren von *TLR4* zwischen Mensch und Maus stark konserviert sind, wurden auch für diesen Rezeptor Unterschiede beschrieben. Die Expression des *TLR4* Rezeptors ist größtenteils auf Zellen myeloischen Ursprungs (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten) beschränkt. Eine schwächere Expression wurde aber auch auf B-Zellen sowie Endo- und Epithelzellen nachgewiesen (Hornung, V. et al. 2002, Muzio, M. et al. 2000). Während beim Menschen die Expression von *TLR4* hauptsächlich in der Milz und den peripheren Blutleukozyten detektiert wurde (Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. 2002), scheint bei der Maus der LPS-Sensor ubiquitär exprimiert zu sein. Am stärksten ist die mRNA Expression in den Geweben der Lunge, Herz und Milz, gefolgt von einer deutlichen Expression in Muskel, Leber und Niere (Kalis, C. et al. 2003, Qureshi, S. T. et al. 1999).

Schon bevor *TLR4* als der Rezeptor für LPS bekannt war, wurden in beiden Spezies Unterschiede in der LPS-Toxizität festgestellt. Berczi et al. zeigten, dass die Maus wesentlich weniger sensitiv gegenüber LPS ist als der Mensch (Berczi, I. et al. 1966). Untersuchungen zur Regulation von *TLR4* ergaben eine Induktion des *TLR4* Transkripts nach LPS-Stimulierung in humanen Monozyten (Muzio, M. et al. 1998, Muzio, M. et al. 2000, Roy, M. F. et al. 2006), während in murinen Makrophagen nach einer Stimulierung verringerte *Tlr4* Spiegel nachgewiesen wurden (Matsuguchi, T. et al. 2000b, Nomura, F. et al. 2000, Poltorak, A. et al. 1998).

Neuere Studien mit transgenen Mäusen, die eine erhöhte Kopienzahl des *Tlr4* Gens aufweisen, zeigten dass die Stärke der LPS-induzierten Immunantwort (gemessen an IL-6 Produktion und Proliferation von Milzzellen) abhängig von der Menge des *Tlr4* Transkripts ist (Bihl, F. et al. 2003, Kalis, C. et al. 2003, Roy, M. F. et al. 2006). Eine mögliche Ursache der Spezies-spezifischen LPS-Sensibilität könnte deshalb die unterschiedliche Regulation der *TLR4* Transkription darstellen. Eine Sequenzanalyse der *TLR4* Promotoren deutete aufgrund der Anwesenheit mehrerer Ets-Motive und dem Fehlen von TATA-Box oder Initiator-Elementen auf einen typischen myeloischen Promotor hin (Rehli, M. 2002). Die Arbeitsgruppe von Thierry Roger konnte bereits die Bindung von PU.1, einem strikt myeloischen Transkriptionsfaktor aus der Ets-Familie, an eines der Ets-Motive des murinen *Tlr4*

Promotors nachweisen (Roger, T. et al. 2001, Roger, T. et al. 2005). Schon zuvor wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass PU.1 für die Expression des humanen *TLR4* Gens essentiell ist, wobei im Menschen andere Bindungsstellen als in der Maus funktionell wichtig waren. Gleichzeitig wurde neben PU.1 ein weiterer hämatopoetischer Transkriptionsfaktor aus der IRF (Interferon Regulatory Factor)-Familie, IRF8, für die *TLR4* Expression beim Menschen verantwortlich gemacht (Rehli, M. et al. 2000).

1.4 Essentielle Transkriptionsfaktoren der Monopoese

1.4.1 PU.1 und seine Interaktionspartner

PU.1 gehört zur über 30 Mitglieder umfassenden Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren, die wichtige biologische Prozesse wie Proliferation und Differenzierung steuern (Li, R. et al. 2000). Viele Ets-Faktoren sind Effektorproteine in Signalkaskaden und übertragen extrazelluläre, Rezeptor-vermittelte Signale in den Zellkern (Yordy, J. S. and Muise-Helmericks, R. C. 2000).

Allen Ets-Faktoren ist die 85 Aminosäuren lange, konservierte Ets-DNA-Bindedomäne gemeinsam, die sich durch eine HTH (Helix-turn-Helix)-Struktur auszeichnet. Die DNA-Bindung wird über eine von den drei α -Helices und zwei „Loops“ hergestellt (Abbildung 1-5).

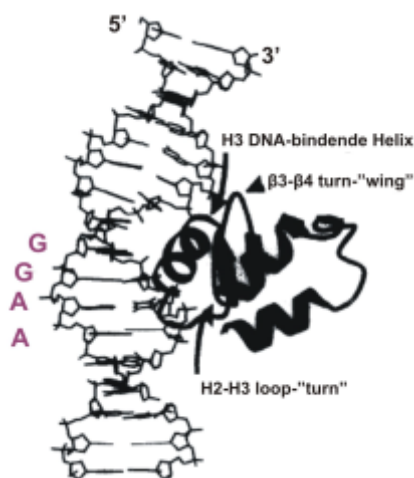


Abbildung 1-5. Ets-Bindedomäne

NMR-Struktur der Bindung der Ets-Domäne an das zentrale 5'-GGAA-3'-Motiv der DNA. Die drei Kontaktpunkte sind gekennzeichnet. Abbildung von Logan Donaldson (Sharrocks, A. D. et al. 1997)

Im inaktiven Zustand unterliegen Ets-Faktoren oft einer intramolekularen Autoinhibition. Ihre Aktivierung kann durch Phosphorylierung (MAPK-Signalweg)

oder Konformationsänderung induziert werden (Crepieux, P. et al. 1994, Jonsen, M. D. et al. 1996). Ganz allgemein erkennen Ets-Transkriptionsfaktoren das purinreiche DNA-Motiv 5'-GGAA/T-3', wobei die bevorzugte Bindung bestimmter Familienmitglieder, z.B. Elk1, Ets-1, Fli1 und Elf1 einschließlich PU.1, von der direkten Sequenzumgebung beeinflusst wird (Sharrocks, A. D. et al. 1997).

PU.1 ist ein einzigartiger Regulator der Hämatopoese, insbesondere der Monopoese. Seine Expression ist strikt Zelltyp-spezifisch und erfolgt ausschließlich in myeloischen Zellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Osteoklasten sowie B-Zellen. PU.1-defiziente Mäuse zeigen eine defekte Entwicklung von myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen und eine damit verbundene frühe Lethalität der Nachkommen bereits im Embryonalstadium oder kurz nach der Geburt (McKercher, S. R. et al. 1996, Scott, E. W. et al. 1994). DeKoter et al. konnten die Proliferations- und Differenzierungshemmung PU.1-defizienter Vorläuferzellen auf die fehlende Expression von myeloischen Wachstumszytokinrezeptoren (GM-CSFR, M-CSFR und G-CSFR) zurückführen (DeKoter, R. P. et al. 1998). Durch retrovirale Transduktion des G-CSF- oder M-CSF-Rezeptors in diese Zellen konnte gezeigt werden, dass PU.1 nicht nur für die Proliferation sondern auch für den Differenzierungsprozess wichtig ist (Anderson, K. L. et al. 1999, DeKoter, R. P. et al. 1998). Weitere Zielgene von PU.1 in der hämatopoetischen Entwicklung sind z.B. die schweren und leichten Immunglobulin (Ig)-Ketten in B-Zellen (Perkel, J. M. and Atchison, M. L. 1998), PU.1 selbst (Chen, H. et al. 1995) und nicht zuletzt die TLRs (Rehli, M. 2002).

Strukturanalysen ergaben, dass Ets-Proteine meist als Monomere an die DNA binden (Kodandapani, R. et al. 1996), jedoch häufig mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (Li, R. et al. 2000). In vielen Promotor/Enhancer-Elementen befinden sich angrenzende Ets- und AP1-Bindemotive (Wasylyk, B. et al. 1993). Die Kooperation der beiden Transkriptionsfaktoren ist Voraussetzung für die Expression vieler Gene einschließlich einer Reihe von Zytokinen (Gottschalk, L. R. et al. 1993, Wang, C. Y. et al. 1994).

Ein weiteres Beispiel für Interaktionen mit Ets-Faktoren ist der Transkriptionsfaktor PIP (PU.1 Interaction Partner), der nur in Anwesenheit von PU.1 an die Erkennungssequenz seiner Zielgene, z.B. am *IGK*-Enhancer (Eisenbeis, C. F. et al. 1995) oder am *CD20* Promotor (Himmelman, A. et al. 1997) bindet.

Eine synergistische Aktivierung der Ets-Faktoren wurde auch mit bHLH-Transkriptionsfaktoren beschrieben, welche typischerweise E-Box-Motive erkennen und an der Regulation spezifischer Entwicklungsprozesse beteiligt sind. Durch die Interaktion von USF1 mit der Ets-Domäne von Ets1 wird z.B. die HIV-Expression aktiviert (Sieweke, M. H. et al. 1998). Die beiden bHLH-Proteine E47 und TFE3, ein Mitglied der Mikrophthalmia-Familie, sind abhängig von Ets1 an der *IGHM* Transkription beteiligt (Dang, W. et al. 1998).

Hagemeier et al. beobachteten eine Interaktion von PU.1 mit TBP (TATA-bindendes Protein), einer wichtigen Komponente des Transkriptionskomplexes (Hagemeier, C. et al. 1993).

Folglich könnte PU.1 für die Transkriptionsinitiation in Makrophagen verantwortlich sein. Weitere Hinweise dafür ergab eine Studie, in der durch die Aneinanderreihung mehrerer Ets-Motive in einem ansonsten promotorlosen Luziferase-Reporterkonstrukt eine Makrophagen-spezifische Reporterexpression vermittelt wurde (Ross, I. L. et al. 1998). Bisher ist jedoch unklar, ob PU.1 *in vivo* in der Lage ist, den Transkriptionsstart zu bestimmen und den Transkriptionsinitiationskomplex zu rekrutieren.

1.4.2 ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein)

Der Transkriptionsfaktor ICSBP (auch IRF8 genannt) gehört zur IRF (Interferon Regulatory Factor)-Familie und wird, wie das Familienmitglied IRF4 (oder PIP), ausschließlich in myeloischen und lymphatischen Zellen exprimiert (Muzio, M. et al. 1998). Die Bezeichnung dieser Transkriptionsfaktorfamilie, die bisher neun Mitglieder (IRF1-IRF9) umfasst, geht auf ihren Einfluss auf die Expression von Typ I und Typ II IFN-induzierten Genen zurück. IRFs sind als wichtige Effektoren in Signalwegen, die durch TLRs und zytosolische PRRs (RIG, MDA5) induziert werden, bekannt und regulieren die Rezeptorgene selbst (Heinz, S. et al. 2003, Nhu, Q. M. et al. 2006). Der Phänotyp von IRF-defizienten Mäusen ist in fast allen Fällen mit einer hohen Anfälligkeit für Infektionen mit ssRNA-Viren und intrazellulären Bakterien assoziiert (Honda, K. and Taniguchi, T. 2006).

Die Generierung von *Icsbp*-defizienten Mäusen zeigte, dass dieser Faktor eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen spielt (Holtschke, T. et al. 1996). Im Einklang mit dieser Beobachtung wurde gezeigt, dass die Expression von ICSBP in hämatopoetischen

Vorläuferzellen induziert wird und während der Differenzierung der oben genannten Immunzellen weiter ansteigt (Tsujimura, H. et al. 2002, Tsujimura, H. et al. 2003). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Überexpression von ICSBP zu einer Verschiebung der Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen führt: es entstehen bevorzugt Makrophagen und weniger Granulozyten (Tamura, T. et al. 2000). Dadurch kann zum Teil die Beobachtung erklärt werden, dass Icsbp-defiziente Mäuse ein CML (Chronic Myelogeneous Leukemia)-ähnliches Syndrom entwickeln, welches durch eine starke Proliferation der Granulozyten und dem Fehlen differenzierter Makrophagen gekennzeichnet ist (Holtschke, T. et al. 1996). Icsbp-defiziente CD8 α dendritische Zellen zeigen Defizite in der Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung (Mattei, F. et al. 2006). Überdies fehlen diesen immundefekten Mäusen plasmacytische DCs, die Hauptproduzenten von INF α bei viralen Infektionen (Cella, M. et al. 1999).

Der hämatopoetische Transkriptionsfaktor ICSBP zeichnet sich durch drei funktionelle Domänen aus, einer DNA-Bindedomäne (Helix-turn-Helix), einer Transkriptions-Repressordomäne und einer Protein-Interaktionsdomäne (Sharf, R. et al. 1995). ICSBP ist ursprünglich als Repressor der Transkription IFN-induzierbarer Gene, wie z.B. MHC I (Nelson, N. et al. 1993, Weisz, A. et al. 1992) charakterisiert worden.

Dabei kann ICSBP alleine nicht an DNA binden. Erst nach Dimerisierung mit weiteren IRF-Mitgliedern oder anderen Transkriptionsfaktoren wird eine Bindung an die DNA ermöglicht (Sharf, R. et al. 1997). Abhängig von Interaktionspartner und DNA-Motiv wirken ICSBP-Komplexe aktivierend oder reprimierend.

Der ICSBP/IRF1-Komplex aktiviert z.B. die Expression von *NOS2A* (iNOS) (Xiong, H. et al. 2003), reprimiert aber *ISG15* (Rosenbauer, F. et al. 1999). Eklund et al. identifizierten einen Komplex aus ICSBP und PU.1, der die Expression von *CYBB* (gp91^{phox}, eine katalytische Untereinheit der „Respiratory Burst“ Oxidase) in differenzierten Phagozyten induziert. Eine Voraussetzung für die Dimerisierung ist jedoch die Phosphorylierung von PU.1 am Serinrest 148, die von einer Kinase als Teil einer Signalkaskade durchgeführt wird (Eklund, E. A. et al. 1998). Durch die Interaktion von ICSBP und dem Ets-Faktor PU.1 (Tabelle 1-1) werden viele immunmodulatorische Gene aktiviert, z.B. *IL1B* und *TLR4* (Buras, J. A. et al. 1995, Rehli, M. et al. 2000).

Tabelle 1-1. Interferon Konsensussequenzen

ISRE (IFN-Stimulated Response Element), EIRE (Ets/IRF Response Element), EICE (Ets/IRF Composite Element) und IECS (IRF/Ets Composite Sequence). Aktivierende oder reprimierende Eigenschaften der Transkriptionsfaktoren sind durch +/- gekennzeichnet (Tamura, T. et al. 2005).

	Konsensussequenz 5' → 3'	ICSBP	ICSBP/IRF	ICSBP/PU.1
ISRE	A/GNGAAANNGAAACT	-	+/-	
EIRE	GGAAANNGAA			+
EICE	GGAA NNGAA			+
IECS	GAAANN (N) GGAA			+

Wie PU.1 ist ICSBP ein wichtiger Transkriptionsfaktor vor allem in der Entwicklung und Aktivierung von mononukleären Phagozyten (Marecki, S. et al. 1999).

2. Ziele

Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass die Empfindlichkeit einer TLR-abhängigen Immunantwort mit dem Expressionsspiegel des entsprechenden Rezeptors (TLR) korreliert. TLR Gene werden in Maus und Mensch z.T. unterschiedlich exprimiert und eine Spezies-spezifische Regulation dieser Rezeptoren könnte unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber TLR-Agonisten (z.B. gegenüber LPS) erklären.

Ziel dieser Arbeit war es, Mechanismen der Transkription von TLR Genen (hauptsächlich *TLR4*) auf der Ebene der Genpromotoren zu analysieren und mögliche Unterschiede zwischen Mensch und Maus zu charakterisieren, die für die angeborene Immunantwort in beiden Spezies wichtig sein könnten. Aufbauend auf bereits publizierten Arbeiten zum humanen *TLR4* sollten die Genpromotoren in Mensch und Maus durch *in vitro* und *in vivo* Studien detailliert charakterisiert werden. Es sollten Transkriptionsstartpunkte und Promotoren definiert (RNA-Ligation Mediated RACE-PCR), für die Transkription wichtige *cis*-Elemente identifiziert (*in vivo* DMS Footprinting, Reporterassays) und die bindenden Transkriptionsfaktoren charakterisiert werden (EMSA, ChIP Analysen).

Der Vergleich der TLR Expression in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen sollte zusätzlich Aufschluss über das Ausmaß Zelltyp-abhängiger *TLR4* Expression geben. Die Promotoranalysen sollten durch Experimente mit Icsbp-defizienten Makrophagen ergänzt werden, um die Notwendigkeit dieses Transkriptionsfaktors für die Transkription von TLR Genen in der Maus zu untersuchen.

Eine Dysregulation der *TLR4* Expression kann bei einer Infektion verheerende Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben. Deswegen ist es wichtig die Regulationsmechanismen dieses wichtigen Rezeptors zu kennen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Geräte

Autoklav	Walter, Geislingen
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Elutriator, Avanti J-20XP	Beckmann Coulter, USA
Heizblock	StuartScientific, Staffordshire
Lightcycler	Roche, Mannheim
Luminometer Sirius	Berthold, Kanada
Mikroskope	Zeiss, Jena
Megafuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
NanoDrop	PeqLab, Erlangen
PCR-Thermocycler (Modell PTC-200)	MJ-Research/Biometra
pH-Meter	Knick, Berlin
Phosphoimager	Amersham, Braunschweig
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank (Lamin Air: HA 2472)	Heraeus, Osterode
Sonifier 250	Branson, Danbury
Wasserbäder	Julabo, Seelstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Polystyrolröhrchen für Luminometer	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn

Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturplatten (6, 12, 24 Vertiefungen)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

3.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde autoklaviertes, zweifach-destilliertes Millipore-Wasser verwendet. RNA-Pellets wurden in DEPC-behandeltem USB-H₂O von der Firma Amersham (Braunschweig) resuspendiert.

3.1.4 Antikörper

IgG Gesamt	Ziege IgG	Santa Cruz
IgG Gesamt	Kaninchen IgG	Upstate
Anti-Acetyl-Histone H3	Kaninchen Antiserum	Upstate
Anti-Acetyl-Histone H4	Kaninchen Antiserum	Upstate
Anti-AP1	Ziege polyklonal	Santa Cruz
Anti-Dimethyl-Histone H3 (Lys4)	Kaninchen Antiserum	Upstate
Anti-Trimethyl-Histone H3 (Lys4)	Kaninchen monoklonal	Upstate
Anti-RNA Polymerase II	Maus monoklonal IgG1	Abcam
Anti-PU.1	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz
Anti-TFEB	Ziege polyklonal	Santa Cruz
Anti-TFE3	Ziege polyklonal	Santa Cruz
Anti-USF1	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz
Anti-USF2	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz

3.1.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen, Hilden
Dynal Dynabeads M-270	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Ladder 1 kb plus	Invitrogen, Karlsruhe
Expand High Fidelity PCR Systeme	Roche, Mannheim
First Choice RLM-Race	Ambion, Austin

MicroSpin™ G-25 Columns	GE Healthcare, Buckinghamshire
NucleoSpin Extract II	Macherey & Nagel, Düren
Protease Inhibitor Set	Roche, Mannheim
Plasmid mini Kit	Macherey & Nagel, Düren
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Roche, Mannheim
Pfu Turbo DNA polymerase	Stratagene
QuantiTect SYBR green	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim
	NEB, Massachusetts, USA
Reverse Transkriptase SuperSkript II	Promega, Madison, USA
RNase	Roche, Mannheim
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden
Rapid Ligation Kit	Roche, Mannheim
Taq PCR Mix	Promega, Madison, USA
Taq DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, USA
Ultrafree-MC Filter	Millipore, Madison, USA
Ultra Pure Sequencing Gel	National Diagnostic, Georgia, USA
Vent (Exo-) DNA Polymerase	NEB, Massachusetts, USA

3.1.6 Vektoren

pCR®2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
--------------	-----------------------

Luziferase-Reportervektoren:

pGL3 Basic	Promega, Madison, USA
pGL4.10 Basic	Promega, Madison, USA
pCMV-hRL	Promega, Madison, USA
pGL3-P	Promega, Madison, USA

Expressionsplasmide:

pRc/CMV	}	Erhalten von C. Vinson (Krylov, D. et al. 1997)
pRc/A-Mitf		
pRc/A-USF		
pRc/A-Max		
pEBB-TFEB	}	Erhalten von C.A. Roman (Huan, C. et al. 2005)
pEBB-TFE3		
pCR3-USF1	}	Erhalten von A. Martinez (Viollet, B. et al. 1996)
pCR3-USF2a		

3.1.7 Oligonukleotide

Die im folgenden nach Verwendung unterteilten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) oder Operon (Hilden) bestellt.

Sequenzierung:

RV3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GL2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTCCA
T7	TAATACGACTCACTATA
M13fw	TTGTAAAACGACGGCCAGTG
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATGAT

Mutagenese:

mWt s	CAATGAAGGGACCCAGTCTCTC
mWt as	TATCCATGGCCATGATCAGAGTCCTAGCC
mPU.1_8s	ATATGTGTCTCTAGTCTGAAACATCCAG
mPU.1_8as	TAGAGACACATATTTTCTCACAATGCTAG
mPU.1_7s	TGAAAATAAAGAAACTATGAGGATGTTGCTCCACG
mPU.1_7as	CTCATAGTTTCTTTATTTTCAACAGAGG
mPU.1_6s	GGTCAGATGACTTAATGGGATGAAAG
mPU.1_6as	GCTTTCATCCCATTAAGTCATCTGAC
mPU.1_5s	GAAAGCCAGCTAGTTCTTGCTGTTCTCCTC
mPU.1_5as	GAGGAACAGCAAGAAGCTAGCTGGCTTTC
mPU.1_4s	TGTAGTTCCAGTCGGTCAGCAAACGCCTTC
mPU.1_4as	CCGACTGGAAGCTACAGCAAGAGGAAGC
mPU.1_3s	CAAACGCCTTCTAGTTGTTCTAGTCT
mPU.1_3as	AGACTAGAACAAGCTAGAAGGCGTTTG
mPU.1_2s	AGTCTTCTAACTAGTCTCCTGCGACGGGGC
mPU.1_2as	AGGAGACTAGTTAGAAGACTGAAGACTAGAAC
mPU.1_1s	GCACTCTCACTAGTTCTTTGAATATAGTAC
mPU.1_1as	GTACTATATTCAAAGAAGCTAGTGAGAGTGC
hNGPs	GTGGGGCGGCTCGAGGGAGGGAAGAGGCAGG
hNGPas	TCGAGCCGCCCCACAGCAATTGGTGTATTCAAAGAGGAAGTGAGA

hWt s	CTCCATGGCACATTCTGCAGTAACTTGGAGGC
hWt as	CACGCAGGAGAGGAAGGCCATGGCTG
mPU.1_5s	GCCAACTAGCTAGTTCTTGCTGTTTCTTTAG
mPU.1_5as	CTAAAGAAACAGCAAGAACTAGCTAGTTGGC
mPU.1_2s	CTTCTTCTAACTAGTTCTCCTGTGAC
mPU.1_2as	GTCACAGGAGAACTAGTTAGAAGAAG
mIRFs	CGCTAGTACTTCCTCTCACCCCTT
mIRFas	AAGGGTGAGAGGAAGTACTAGCG
mPU.1_1s	CGCTTTCCTAGTTCTCACCCCTT
mPU.1_1as	AAGGGTGAGAACTAGTGAAAGCG
mNFYs	CAGTACTTGCTGTGGGGCGGCTCGAGG
mNFYas	GCCCCACAGCAAGTACTGTATTCAAAGCAGTTC
mGcs	ACCAATTGCTGTTTCAGCGGCTCGAGG
mGCas	CTCTGTGGTTTCTGGTACCTCCTCTGG
mPU.1_0s	GGGCGGCTCGAACTAGAGAAGACACC
mPU.1_0as	GGTGTCTTCTCTAGTTTCGAGCCGCCC
mINRs	CTCGGTGTCCGTGTGATAGCGAGCCAC
mINRas	CTATCACACGGACACCGAGCAGTTTCTGAGGC
INR PU.1s	GTGTGGAAGTGATAGCGAGCC
INR PU.1as	TATCACTTCCACACCGAGCAG
Ch1s	AGCAAATACTGAAGCAGTAAGCATCCTC
Ch1as	ACTGCTTCAGTTAGTTTGCTGGGGCTGCC
Ch2s	CTAAATTCACCAAGCCCAGAGGTCAGATGAC
Ch2as	TCTGGGCTTGGTGAATTTAGGAAAACAATC
Ch3s	ACTGGTCAGCAAACGCCTTCTTCC
Ch3as	CGTTTGCTGACCAGTGGCTAAAGAAACAG
Ch5s	CACCAGTGTCCCAGGGACTCTG
Ch5as	CCTGGGACACTGGTGTCTTCTCTTCC
Ch6s	ACAGATCGTCATGTTCTCTCAT
Ch6as	GAACATGACGATCTGTGAATGCGTGGCTCG
Ch7as	ATCTCCATGGCCATGATCAGAGTCCTAGCCAGGAGCCAGG GAGGCATCATCTGGCAT
Ch8s	AGACTTGGGAGTCTAATACAAATAGTGTTCAC
Ch8as	TATTAGACTCCCAAGTCTCCCAGAGCACAG
Ch9s	CCTTCACCAAGCCCAGGCAGAGGTC
Ch9as	CTGGGCTTGGTGAAGGCAGGGAAGTGGCG
Ch10s	TCGGTCTGCAGGCGTTTTCTTCTTC
Ch10as	AAAACGCCTGCAGACCGACTGGAGGAAC
Ch12s	CAGGTGTCTCAGAACTGCTCGG
Ch12as	CAGTTTCTGAGACACCTGCCTCTTCCC
Ch13s	CCACCAGTTACAGGGCCACTGCTGCTC
Ch13as	TGTAAGTGGTGGCAGCGCAGAGTCCC
Ch7m s	CGAGCCACGCATTACAAATGTCACTTCATGGCACAGA AGCAGTTAGGAAAATGCCAGGATGATGC
Ch7m as	TGTGCCATGAAGTGACATTGTGAATGCGTGGCTCG
ATGm s	CAGATCGTCTAGTTCTCTCTAGGCCT
ATGm as	AGGCCTAGAGAGAACTAGACGATCTG
dmWt as	CAGTACCATGGTTAGAAGACTGAAGACTAGAACAGG
mAP1s	AGAGGTCAGAGTACTTCCTGGG
mAP1as	GAAGTACTCTGACCTCTGGGC

Real-time-PCR:

hTLR4Ex23s	TTAGGCAGCTATAGCTTCTTCAGTTTCC
hTLR4Ex23as	CCCATCTTCAATTGTCTGGATTTACAC
hHPRTs	AAGTTTGTTGTAGGATATGCCC
hHPRTas	GAACATTGATAATTTTACTGGCG
hPU.1s	CCAACGCCAAACGCACG
hPU.1as	CGCCGTCAGACACCTCCAG

mTLR4Ex12s	TGGCTAGGACTCTGATCATGGC
mTLR4Ex12as	TGAAGAAGGAATGTCATCAGGG
mHPRTs	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC
mHPRTas	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
mPU.1s	TCTATCGCCACATGGAGCTG
mPU.1as	TTGATAAGGGAAGCACATCCG

5' RLM Race PCR:

hTLR4-out	CTTTCTGGTCTCACGCAGGAGAGG
hTLR4-in	CCATGGCTGGGATCAGAGTC
mTLR4-out	ACTACCTCTATGCAGGGATTCAAGC
mTLR4-in	GTGCCATGATCAGAGTCCTAGCC
5'PCR-lucAS	AACGCGCCCAACACCG
pGL2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
LPL out	AGGCGGTCAAACCTCTGGAGC
LPL in	AGGACCACCAGGAGCAGGGC
Chi3L3 out	TAGGAAGATCCCAGCTGTACG
Chi3L3 in	CCAGACCTGTGACAAGAATGAGC
CD14 out	AGAGGCGTGCACCAGAAGC
CD14 in	AGGACCACCAGGAGCAGGGC

ChIP:

-250- -90s	ACCAAGCCCAGAGGTCAGATGAC
-250- -90as	CTCACTTTTGGTTTTGTTCTAGAA
-20- +111s	AAGAGGCAGGTGTCCCAGGG
-20- +111as	CCATGATCAGAGTCCTAGCCAGG
-15561- -15455s	GTAGACAAAGATAAAGGTGAGACAGCAG
-15561- -15455as	CCTGGATTAGAACCGAAGGATCAGAG
GAPDH s	CATCGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
GAPDH as	GGCATCTTGGGCTACACTGAG

In vivo Footprinting:

MII1s	bio-AAGAAGGAATGAGGATGTTG
MII2s	ACCAAGCCCAGAGGTCAGATGAC
MI1as	bio-AAGTGAGAGTGCCAACCTTAG
MI2as	CTCACTTTTGGTTTTGTTCTAGAATCG
HII1s	bio-ATGACTAATTGGGATAAAAGCC
HII2s	TAGCTTCCTCTTGCTGTTTCTTTAGCC
HI1as	bio-TATTCAAAGCAGTTCTGGGC
HI2as	TGAGAGGAAGTGAAAGCGGCAACC
LP25	Cy5-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC

3.1.8 Bakterienstämme

Folgende *E. coli* Bakterienstämme wurden verwendet:

TOP10: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

DH10B: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

3.1.9 Zelllinien

Human:

HT29	Kolon-Adenokarzinom	(DSMZ ACC 299)
THP1	Akute myeloische Leukämie	(DSMZ ACC 16)

Maus:

RAW264.7	Monozyten-Makrophagen	(ATCC TIB 71)
PUER	Myeloischer Progenitor	(H. Singh, Chicago)
CT26	Kolonkarzinom	(ATCC CRL-2638)
NIH3T3	Embryonische Fibroblasten	(ATCC CRL-1658)

3.2 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, basierten die Protokolle auf Anweisungen aus den „Current protocols of Molecular Biology“ (Ausubel Frederick, M Brent R and Kington RE 2006) und dem „Molecular cloning laboratory manual“ (Sambrook, J and Russel DW. 2001).

3.2.1 Bakterienkultur

Alle *E.coli* Stämme wurden auf LB_{amp}-Agaroseplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Vermehrung wurden davon Einzelkolonien in flüssiges LB_{amp}-Medium überimpft und wiederum bei 37°C über Nacht geschüttelt (200 Upm). Für ein Blau/Weiß-Screening zur Identifizierung von Klonen, die ein Insert enthalten, wurde die LB_{amp}-Platte mit zusätzlich 40 µl X-gal vorbehandelt und dann die transformierten Bakterien darauf verteilt.

Lösungen/Reagenzien zur Bakterienkultur:

LB-Medium:	10 g NaCl	
	10 g Bactotryptone	
	5 g Yeast Extract	
	H ₂ O ad 1 l	→ autoklaviert.
LB-Platten:	15 g Agar	
	LB-Medium ad 1 l.	→ autoklaviert.
X-gal	40 mg X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)	
	DMF ad 1 ml (Bei -20°C dunkel gelagert).	

Für LB_{amp} wurde nach dem Abkühlen auf 60°C 100 µg/ml Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Die noch warme Agarlösung wurde in 10 cm Petrischalen gegossen und umgedreht bei 4°C gelagert.

3.2.2 Präparation von kompetenten *E. Coli*

Benötigte Reagenzien:

FSB (4°C):	10 ml	(10 mM)	Kaliumacetat 1 M, pH 7.5
	8,91 g	(45 mM)	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	1,47 g	(10 mM)	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	7,46 g	(100 mM)	KCl
	0,72 g	(3 mM)	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	100 ml	(10%)	Glycerin

H₂O ad 1 l, pH 6.4 mit 0,1 N HCl.

DH10B Bakterien wurden in 100 ml LB-Medium auf eine Dichte von 0,5 OD_{600nm} hochgezogen, in vier 50 ml Röhrchen umgefüllt und abzentrifugiert (4000 Upm, 10 min, 4°C). Das Medium wurde gründlich abgenommen (Röhrchen einige Zeit umgedreht stehen lassen), die Bakterien in je 20 ml eisgekühltem FSB resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gestellt und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder möglichst vollständig entfernt und die Zellen in je 4 ml FSB resuspendiert. Nach der Zugabe von 140 µl DMSO auf je 4 ml resuspendierte Zellen wurden die Bakterien durch vorsichtiges Schwenken der Röhrchen resuspendiert und 15 Minuten auf Eis gestellt. Weitere 140 µl DMSO pro Röhrchen wurden zugegeben, die Röhrchen geschwenkt, die Bakterien sofort in kleinere Röhrchen umgefüllt und möglichst schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

3.2.3 Transformation von *E. coli*

Reagenzien :

SOC-Medium:	20 g	Bactotryptone
	5 g	Yeast Extract
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	H ₂ O ad 1 l	→ autoklaviert.
Nach dem Abkühlen:	10 ml	MgCl ₂ (1 M), sterilfiltriert.
	10 ml	MgSO ₄ (1 M), sterilfiltriert.
	10 ml	Glucose (2 M), sterilfiltriert.

Ein Volumen von 100 µl kompetenten Bakterien wurde zur Plasmid-DNA (0,1 - 1 µg in 20 µl) pipettiert, gemischt und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Im Wasserbad wurden die Bakterien für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt und sofort wieder für zwei Minuten auf Eis gesetzt. Nach der Zugabe von 0,5 ml SOC Medium wurden die Bakterien bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf geeigneten Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Es wurden mehrere der hochgewachsenen Kolonien gepickt und nach Kultivierung über Nacht Minipreps hergestellt. Die korrekte Transformation wurde durch einen Restriktionsverdau und anschließende Sequenzierung kontrolliert. Für eine Langzeitaufbewahrung korrekter Bakterienklone wurde ein Glycerinstock (1 ml) einer 1:1 Mischung aus Glycerin und der Bakteriensuspension angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA für die weitere Verwendung wurde eine Miniprep nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien mit dem NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kit (Macherey & Nagel) nach Anleitung des Herstellers angefertigt. Für größere und reinere Mengen an DNA wurde der QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet, wobei für die Herstellung von Transfektions-DNA störende Endotoxine mit einem zusätzlichen Puffer (Endotoxin Removal Buffer, QIAGEN) entfernt wurden.

3.2.5 Mutagenese, Klonierung und Analyse von DNA

3.2.5.1 Gelelektrophorese für DNA

Benötigte Lösungen:

TAE (50x):	242,3 g	(2 M)	Tris
	20,5 g	(250 mM)	NaOAc/HOAc pH 7.8
	18,5 g	(50 mM)	EDTA
	H ₂ O ad 1 l.		

Ladepuffer (5x):	500 µl	(50 mM)	1 M Tris/HCl pH 7.8
	500 µl	(1%)	SDS (20%)
	1 ml	(50 mM)	EDTA (0,5 M, pH 8.0)
	4 ml	(40%)	Glycerin
	10 mg	(1%)	Bromphenolblau
	H ₂ O ad 10 ml.		

Tabelle 3-1. DNA-Agarosegele

	1% Agarose		3% Agarose
TAE (1x)	50 ml	150 ml	150 ml
Agarose	0,5 g	1,5 g	4,5 g
EtBr	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Die jeweilige in Tabelle 3-1 angegebene Agarosemenge wurde mit der entsprechenden Menge an 1x TAE versetzt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Ethidiumbromid (EtBr) wurde erst nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50-60°C zugegeben und dann das Gel gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Vier Teile DNA-Probe wurden mit einem Teil DNA-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Je nach Größe der Kammer erfolgte der Lauf bei 40-120 V für 0,5 - 2 Stunden.

3.2.5.2 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau oder PCR-Amplifikation wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits (Macherey & Nagel) nach Anleitung des Herstellers die DNA extrahiert.

3.2.5.3 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen wurden die Puffer- und Enzymkombinationen der Firma NEB und Roche verwendet. Grundsätzlich wurden 5 U Enzym/µg DNA in einem Endvolumen von 20 µl, bestehend aus H₂O, 10% enzymabhängiger Puffer und DNA, eingesetzt und bei 37°C für 1,5 Stunden verdaut.

3.2.5.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

Isolierte und durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente wurden über Restriktionsschnittstellen in entsprechend geschnittene Plasmide ligiert. Dabei wurde die DNA im Verhältnis Insert/Vektor 3:1 eingesetzt und die Ligation mit dem

Rapid Ligation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei RT konnte die Transformation gleich anschließend erfolgen.

3.2.5.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen wurden von Entelechon oder Geneart (Biopark, Regensburg) vertragsmäßig angefertigt. Sequenzvergleiche und -analysen wurden mit folgenden Programmen durchgeführt: Generunner, Blast (National Center of Biotechnology Information), MatInspector und PromoterInspector (Genomatix.de) und Repeatmasker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>).

3.2.6 Präparation und Analyse von RNA

Für alle Arbeiten mit RNA ist es besonders wichtig, eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Es wurde strikt mit Handschuhen, RNase-freien Gefäßen und Pipetten gearbeitet. Alle Lösungen wurden ausschließlich mit RNase-freiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ hergestellt. Dafür wurde das Wasser mit 0,1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) versetzt, mehrmals durchgeschüttelt und über Nacht inkubiert. Durch zweifaches Autoklavieren wurde DEPC inaktiviert.

3.2.6.1 RNA Extraktion mit Guanidin-Phenol-Chloroform

Benötigte Reagenzien:

Solution D:	47,2 g (4 M) 2,5 ml (25 mM) 1,67 ml (0,5%) $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ad 100 ml.	Guanidinthiocyanat NaCitrat (1 M, pH 7.0) Sarcosyl
NaAcetat (2 M):	16,4 g (2 M) ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. → pH 4.0 mit Essigsäure (ca. 40 ml) $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ad 100 ml.	NaAcetat (wasserfrei)
Phenolwasser _{gesättigt, ungepuffert} :	Frisches Phenol wurde im Wasserbad geschmolzen. 0,1% 8-Hydroxychinolin und zweimal 20% $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ wurden zugegeben, geschüttelt und zum Absetzen über Nacht stehengelassen (Phenol war $\frac{1}{4}$ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ überschichtet).	
Chloroform-Isoamylalkohol (49:1):	2 ml (2%) ad 100 ml Chloroform.	Isoamylalkohol
Isopropanol:	Bei 4°C lagern.	

Ethanol (80%):	80 ml (80%) H ₂ O _{DEPC} ad 100 ml (bei 4°C).	Ethanol
Polypropylen-Röhrchen	Chloroform/Phenol-beständig	

Solution D wurde frisch mit 7 µl/ml Mercaptoethanol versetzt. Bei adhärenen Zellen wurde das Medium abgegossen und Solution D auf die Zellen gegeben (2 ml pro 150 mm-Schale). Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt, mit einer Spritze (0,9 x 40 mm) in ein steriles 14 ml Röhrchen überführt und 10x durch die Spritze gedrückt. Nach dem Ansäuern des Lysats mit 2 M NaAcetat (0,1 ml pro 1 ml Lysat) wurde es sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Nichtadhärente Zellen wurden abzentrifugiert, direkt mit der entsprechenden Menge Solution D versetzt und sofort durch die Spritze gedrückt.

Auf 1 ml Lysat wurde die gleiche Menge Phenol und 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol pipettiert und gut geschüttelt. Es sollte sich eine milchige Suspension bilden, andernfalls musste noch Chloroform zugegeben werden. Die Suspension wurde 15 Minuten auf Eis gestellt, zentrifugiert (20 min, 10.000 g, 4°C) und die obere wässrige Phase ohne Interphase abgenommen.

Der Überstand wurde mit gleichem Volumen Isopropanol aufgefüllt, kräftig geschüttelt und bei -20°C gefällt (mind. 1 Stunde, besser über Nacht). Nach dem Zentrifugieren (20 min, 10.000 g, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttelt und Restflüssigkeit aus dem Röhrchen ablaufen gelassen. Das Pellet wurde erneut in Solution D (0,3 ml pro 1 ml Lysat) gelöst und in 1,5 ml-Röhrchen (RNase-frei) überführt.

Das gelöste RNA-Pellet wurde nochmal mit gleichem Volumen Isopropanol aufgefüllt, kräftig geschüttelt und bei -20°C gefällt (mind. 1 Stunde, besser über Nacht). Nach dem Zentrifugieren (20 min, 10.000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem Ethanol (80%) gewaschen.

Die Lagerung erfolgte in Ethanol (100%) bei -80°C oder gelöst in H₂O_{USB} bei -20°C (Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987). Die RNA-Menge wurde mit dem NanoDrop bestimmt (OD₂₆₀ von 1,0 entspricht ca. 40 µg/ml RNA und das Verhältnis OD₂₆₀:OD₂₈₀ war zwischen 1,8 und 2,0).

Alternativ wurde RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers präpariert.

3.2.6.2 Formaldehyd-Agarose-Gel für RNA

Benötigte Lösungen:

MOPS (20x):	42 g (0,4 M)	MOPS/NaOH pH 7.0
	4,1 g (100 mM)	NaAcetat
	3,7 g (20 mM)	0,5 M EDTA pH 8.0
	H ₂ O _{DEPC} ad 500 ml, dunkel gelagert.	
Ladepuffer RNA:	10 ml (50%)	Formamid deionisiert
	3,5 ml (2,2 M)	Formalin (37%)
	1 ml	MOPS (20x)
	0,8 ml (0,04%)	Bromphenolblau 1% in H ₂ O
	0,2 g (1%)	Ficoll (in 2 ml H ₂ O gelöst)
	H ₂ O _{DEPC} ad 20 ml, 1 ml Portionen wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch 5 µl/ml EtBr zugegeben.	

Tabelle 3-2. RNA-Agarosegele

Agarose	0,3 g	0,5 g	1,5 g	2,5 g
H ₂ O _{DEPC}	22,8 ml	38 ml	115 ml	190 ml
MOPS (20x)	1,5 ml	2,5 ml	7,5 ml	12,5 ml
Nach dem Abkühlen auf 60°C				
Formaldehyd	5,3 ml	8,8 ml	26,5 ml	44 ml
insgesamt	30 ml	50 ml	150 ml	250 ml

Laut Tabelle 3-2 wurde die Agarose in MOPS/H₂O_{DEPC} aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, das Formaldehyd unter Rühren zugegeben und gegossen. Die RNA Proben wurden zusammen mit Ladepuffer (1 Teil RNA Probe in H₂O_{USB} + 4 Teile RNA-Ladepuffer) 20 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und in die mit 1x MOPS-Laufpuffer überschichteten Probentaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 40 V für 4-6 Stunden durchgeführt. Zur Überprüfung der RNA auf Kontamination mit RNasen wurden die einzelnen Präparationen zusätzlich für eine Stunde bei 37°C inkubiert und im Vergleich zur nicht-inkubierten RNA-Probe aufgetragen.

3.2.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit Hilfe von zwei entgegengesetzt orientierten, spezifischen Primern lassen sich bei der PCR aus DNA-Proben Gensequenzen amplifizieren (Mullis, K. et al. 1992). Es lassen sich geringe DNA-Mengen und nach vorhergehender reversen Transkription auch zelluläre RNA analysieren. Die Methode wurde auch verwendet

zur gerichteten Mutagenese, als auch zur Klonierung von Reporterkonstrukten und 5'-Transkript-Enden (RACE-PCR).

3.2.7.1 Reverse Transkription (RT-PCR)

Zur quantitativen Bestimmung von TLR-Transkripten (mRNA) sowohl in verschiedenen Zellen als auch nach Stimulationsexperimenten wurde RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde 1 µg RNA in die Reaktion mit M-MLV-Reverser Transkriptase (Promega) zusammen mit *random decamers* (Ambion) eingesetzt und nach folgendem Schema durchgeführt:

RT-PCR Reaktion:

1 µg	Total RNA	
1 µl	<i>Random Decamers</i>	
1 µl	dNTPs (each 10 µM)	
H ₂ O _{USB} ad 15 µl		→ 5 min auf 65°C.
Auf Eis gestellt und abzentrifugiert.		
4 µl	M-MLV Buffer (5x)	→ 2 min auf 42°C.
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase	→ 50 min auf 42°C, 15 min 70°C.

3.2.7.2 Real-time-PCR

Die Methode der Real-time-PCR wurde einerseits zur Quantifizierung der cDNA nach der Reversen Transkription (3.2.7.1) und andererseits zur quantitativen Analyse der präzipitierten DNA-Fragmente nach der Chromosomenimmunpräzipitation (3.2.9) angewandt.

Alle Reaktionen wurden mit dem QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) durchgeführt und sowohl der LightCycler® Apparat der Firma Roche als auch der Eppendorf Gradient S Realplex Mastercycler im 96-Loch Format genutzt.

Standard Real-time-Programm:

Schritte/Cycler	Lightcycler	
Aufschmelzen	94°C	15 min
Aufschmelzen	45 Zyklen	94°C 15 sec
Hybridisierung		57°C 15 sec
Elongation		72°C 25 sec
Schmelzkurve	95°C	15 sec
	65°C	15 sec
	65-95°C	20 min
Abkühlen	30°C	10 min

Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Volumen von 20 µl ausgeführt:

Standard Lightcycler PCR:	10 µl	SYBR Green Mix (2x)
	1 µl	Sense Primer (10 µM)
	1 µl	Antisense Primer (10 µM)
	6 µl	H ₂ O
	2 µl	cDNA (1:4 verd. mit H ₂ O) oder ChIP-DNA (unverd.)

Für alle Primerpaare wurden bei jedem Lauf eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe einer geeigneten Probe (1, 1:10, 1:50, 1:100) generiert, um die Effizienz der Amplifikation zu erhalten. Aus dem erhaltenen *slope*- und *intercept*-Wert konnte die jeweilige DNA-Menge kalkuliert werden. Die Quantifizierung des Haushaltgens *HPRT* diente zur Normalisierung der einzelnen Proben. Zur Kontrolle der ChIP Proben auf mögliche Abweichungen in den Einzelproben wurden entweder Primer im *GAPDH* Gen oder genspezifische TLR4 Primer verwendet, die zur Amplifikation von DNA-Sequenzen, über die keine Transkriptionsfaktor-Bindung bekannt ist, dienen.

Alle Messungen und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

3.2.7.3 PCR-basierte gerichtete Mutagenese

Zur Herstellung von Einzelmutationen und Chimärenkonstrukten wurde das Prinzip der gerichteten Mutagenese-PCR angewandt. Dabei wurden mittels zwei, die Mutation enthaltenden Primern (Mutation s und Mutation as) unabhängig zwei PCR-Fragmente erzeugt (PCR 1+2), die sich in der Mutation überlappen. Nach der DNA-Gelextraktion beider Fragmente wurde in einer dritten PCR-Reaktion mit den jeweiligen äußeren Primern (RV3 und GL2) das gewünschte Fragment hochamplifiziert und mit Hilfe der eingeführten Restriktionsschnittstellen (Mlu I und Nco I) durch die äußeren Primer zur weiteren Klonierung in den pGL3- oder pGL4-Basic Vektor (Promega) nutzbar gemacht.

PCR-Reaktion	PCR 1	PCR 2	PCR 3
DNA Template	1 µg	1 µg	10 µl PCR 1+2
10x Taq Puffer	10 µl	10 µl	-
10x HiFi Puffer	-	-	10 µl
dNTP (10 µM each)	2 µl	2 µl	2 µl
RV3 (10 µM)	5 µl	-	5 µl
Mutation s (10 µM)	-	5 µl	-
Mutation as (10 µM)	5 µl	-	-
GL2 (10 µM)	-	5 µl	5 µl
H ₂ O	ad 98 µl	ad 98 µl	ad 98 µl
Taq	2 µl	2 µl	-
HiFi	-	-	2 µl

Um Amplifikationsfehler durch viele Reaktionszyklen zu vermeiden wurden die PCR-Fragmente mit unterschiedlichen Zykluszahlen (i.A. 6, 9, 12 und 15) analysiert und die Produkte mit der geringsten Anzahl in die dritte PCR eingesetzt.

Folgendes PCR-Programm wurde angewendet:

Schritte/ Cycler	PTC 200
Aufschmelzen	94°C 4 min
Aufschmelzen	x Zyklen 94°C 30 sec 60°C 30 sec 72°C 30 min
Hybridisierung	
Elongation	
Elongation	72°C 7 min
Abkühlen	15°C ∞

3.2.7.4 Transkriptionsstart-Analyse durch 5'-RLM-RACE-PCR

Die Bestimmung der jeweiligen endogenen als auch exogenen (Reporterkonstrukte) Transkriptionsstartpunkte erfolgte mit dem 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Kit von Ambion. Die Herstellung der cDNA, die Adapter-Ligation und anschließende PCR wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die genspezifische Amplifikation (*nested* PCR) wurde die High Fidelity Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Roche) unter *Hot-Start*-Bedingungen verwendet.

PCR Bedingungen:

Schritte/Cycler	PTC 200
Aufschmelzen	94°C 4 min
Aufschmelzen	25-35 Zyklen 94°C 15 sec 63°C 45 sec 72°C 2 min
Hybridisierung	
Elongation	
Schmelzkurve	72°C 7 min
Abkühlen	15°C ∞

Die Analyse erfolgte schließlich durch eine Gelelektrophorese der PCR-Fragmente in einem 2-3% Agarosegel. Zum Nachweis der Spezifität wurden die Produkte der

zweite PCR direkt mit dem TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers kloniert. Von den positiven Klonen wurden mit einer Bakterien-PCR die Inserts hochamplifiziert, mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt und direkt sequenziert (T7-Primer).

Bakterien-PCR:

1 µl	M13 <i>Forward</i> Primer
1 µl	M13 <i>Reverse</i> Primer
8 µl	H ₂ O
10 µl	2x Taq PCR Mix (Promega)

PCR Bedingungen:

Schritte/Cycler	PTC 200
Aufschmelzen	94°C 10 min
Aufschmelzen	94°C 1 min
Hybridisierung	55°C 1 min
Elongation	72°C 1 min
30 Zyklen	
Elongation	72°C 10 min
Abkühlen	15°C ∞

3.2.8 *In vivo* Footprinting

Die Technik des genomischen *in vivo* Footprintings ermöglicht es, die Chromatinstruktur einzelner Gene *in vivo* zu analysieren. Mit Hilfe von chemischen Agenzien (Dimethylsulfat) können DNA-Protein-Interaktionen und strukturelle Veränderungen des Chromatins lebender Zellen im Vergleich zu ebenso behandelte nackter DNA sichtbar gemacht werden (Tagoh, H. et al. 2006).

3.2.8.1 DNA-Präparation von Dimethylsulfat (DMS) und Piperidin behandelten Zellen

Benötigte Lösungen und Reagenzien:

Lysepuffer 1:

2 ml	(20 mM)	Tris-HCl (1 M, pH 8.0)
0,4 ml	(20 mM)	NaCl (5 M)
4 ml	(20 mM)	0,5 M EDTA pH 8.0
5 ml	(1%)	SDS (20%)
H ₂ O ad 100 ml.		

Lysepuffer 2:

3 ml	(150 mM)	NaCl (5 M)
2 ml	(10 mM)	0,5 M EDTA pH 8.0
H ₂ O ad 100 ml.		

DMS-Puffer (2x):	535 mg (50 mM) 100 µl (1 mM) H ₂ O ad 50 ml.	NaCacodylat 0,5 M EDTA pH 8.0
DMS Stop Puffer: (Frisch vorbereitet.)	15 µl (1 M) 105 µl (1,5 M) 90 µl	2-Mercaptoethanol NaAcetat (3 M, pH 7.0) H ₂ O

DMS führt zur Bildung von N-7-Methylguaninen (~70%) und N-3-Methyladeninen (~30%). Mit der Piperidinanwendung im zweiten Schritt erfolgt ein Einzelstrangbruch nach allen methylierten Guaninen. Für die DMS-Behandlung wurden 15-30 x 10⁶ Zellen in 15 cm-Gewebekulturschalen oder Zellkulturflaschen eingesät. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 5 ml DMS-Lösung (0,2% DMS/PBS) überschichtet wurden. Nach 5 Minuten Inkubation wurde das DMS/PBS abgenommen und die Zellen 3x mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Lyse wurden die Zellen zuerst in 5 ml Lysepuffer 2 aufgenommen, dann 5 ml Lysepuffer 1 zugegeben und die Schale/Flasche vorsichtig geschwenkt. Nach Zugabe von 150 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 50 µl RNase (20 mg/ml) wurde das Zelllysate über Nacht bei RT inkubiert.

Es erfolgte eine zweimalige Extraktion mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und anschließend eine Extraktion mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (3.000 Upm, 8 min, 4°C). Die Fällung wurde für mindestens 30 Minuten mit 1/10 Vol 5 M NaCl und 1 Vol Isopropanol bei -20°C durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde pelletiert (3.000 Upm, 8 min, 4°C) und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen (13.000 Upm, 5 min, 4°C) und in 100 µl 0,1x TE gelöst.

Zu 100 µl DMS-behandelter DNA wurde 1 µl Piperidin (10 M) pipettiert, gut vermischt und für 10 Minuten auf 90°C erhitzt. Die Reaktionsgefäße wurden sofort auf Eis gestellt, mit 200-300 µl H₂O verdünnt und 600-800 µl Isobutanol zugegeben (10 Sekunden vortexen). Nach der Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, 4°C) wurde die obere Butanol-Phase entfernt. Der Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt. Dazwischen wurde je nach Bedarf das Volumen der wässrigen Phase mit H₂O wieder aufgefüllt. Dann wurde die DNA-Lösung mit 100-200 µl Chloroform gevortext, zentrifugiert und die jetzt obere Phase mit 1/10 Vol 5 M NaCl und 2 Vol Ethanol bei -20°C für mindestens eine halbe Stunde präzipitiert. Nach der Pelletierung wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen

und in 30-50 µl 0,1x TE aufgenommen. Nach der Bestimmung der Konzentration am Nanodrop wurde die DNA auf 1 µg/µl verdünnt.

Für die Kontrolle (G-Reaktion) wurden 100 µg genomische DNA präzipitiert und in 5 µl H₂O gelöst. Dazu wurden 200 µl DMS-Puffer gemischt und 10 µl 10% DMS/Ethanol (frisch hergestellt) zugegeben. Nach 3 Minuten Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit 30 µl DMS Stop Puffer beendet und mit 750 µl eiskaltem 100% Ethanol aufgefüllt. Die Präzipitation erfolgte für 30 Minuten bei -80°C. Die DNA wurde pelletiert (13.000 Upm, 5 min, 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen und in 99 µl 0,1x TE aufgenommen. Die Spaltung mit Piperidin wurde wie bei den DMS-behandelten DNA-Proben durchgeführt.

3.2.8.2 „Ligation-mediated“ PCR (LM-PCR)

Benötigte Enzyme und Materialien:

Primereigenschaften:

1. Primer: biotinyliert; liegt stromaufwärts vom 2. Primer, ΔT : 55±5°C
2. Primer: *nested* Primer, ΔT : 70±3°C
3. Primer: 5'-Cy5-LP25

2x B&W Puffer :	1 ml (10 mM)	Tris-HCl (1 M, pH 7.5)
	200 µl (1 mM)	0,5 M EDTA pH 8.0
	40 ml (2 M)	NaCl (5 M)
	H ₂ O ad 100 ml.	

2x DNA-Ladepuffer:	10 mg (1%)	Bromphenolblau
(ohne Xylencyanol)	200 µl (10 mM)	0,5 M EDTA pH 8.0
	Formamid ad 10 ml.	

10x TGE:	108 g (0,9 M)	Tris	
	55 g (0,9 M)	Borsäure	→ in 900 ml H ₂ O gelöst.
	40 ml (20 mM)	0,5 M EDTA pH 8.0	→ H ₂ O ad 1l.

Linker:	10 µl LP21 (200 µM)
	10 µl LP25 (200 µM)
	80 µl H ₂ O
	→ 95°C, 5 Minuten und dann bei RT zum Abkühlen stehengelassen.

Die folgenden Angaben für die PCR beziehen sich auf je einen Ansatz und wurden als Mastermix für jede Primerkombination vorbereitet (auf Eis).

1. Primer Elongation:	0,5 µl	10x ThermoPol Puffer
	0,05 µl	dNTPs (25 mM)
	0,05 µl	Biotinylierter 1. Primer
	1,0 µl	Vent Polymerase (2U/µl)
	0,25 µl	DMSO
	x µl	DNA (1,5 µg)
	3,15-x µl	H ₂ O
	<hr/>	
	5 µl, mit 10 µl Öl überschichtet.	

Programm:	Denaturierung	95°C	15 min	}	1 Zyklus
	Hybridisierung	53°C	20 min		
	Elongation	72°C	20 min		

Ligation:	1,22 µl	10x Ligationspuffer
	0,06 µl	BSA
	2 µl	DSL 25-21 Linker
	2,97 µl	H ₂ O
	0,96 µl	T4-Ligase (3U/µl)
<hr/>		
7,21 µl, zur Primer Elongations-Reaktion		
→ 16°C, über Nacht.		

Mit Hilfe der biotinylierten Primer wurden nur die genspezifischen DNA-Fragmente aufgereinigt. Dazu wurden Streptavidin-beladene Dynabeads M-270 (15 µl/Ansatz) zweimal mit 2x B&W gewaschen, in 12,5 µl/Ansatz 2x B&W resuspendiert und zu den ligierten Primer Elongations-Ansätzen gegeben. Nach 1-2 Stunden Rotation bei RT wurden die Beads in einer Magnetvorrichtung mit 100 µl 2x B&W, zweimal mit 100 µl 1x TE pH 7.5 gewaschen und in 10 µl 0,1x TE aufgenommen. Die Elution erfolgte bei 95°C für 10 Minuten.

2. Amplifikation:	18,5 µl	H ₂ O
	5,0 µl	10x Cloned Pfu Puffer
	14 µl	Betain (5 M)
	0,5 µl	dNTPs (25 mM)
	0,5 µl	LP25 (20 µM)
	0,5 µl	2. Primer (20 µM)
	1 µl	Pfu Turbo DNA Polymerase
<hr/>		
40 µl, zur Linker ligierten Primer Elongations-Reaktion.		

Programm:	Denaturierung	95°C	5 min	}	22 Zyklen
	Denaturierung	95°C	45 sec		
	Hybridisierung	56-57°C	3 min		
	Elongation	72°C	5 min		
	Elongation	72°C	10 min		

3. Label-PCR:	0,4 µl	10x Cloned Pfu Puffer
	1 µl	Betain (5 M)
	0,4 µl	dNTPs (2,5 mM each!)
	1 µl	Cy5-LP25 (10 µM)
	1 µl	H ₂ O
	0,2 µl	Pfu Turbo DNA Polymerase
<hr/>		
4 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt + 10 µl PCR Produkt		
→ mit 10 µl Öl überschichtet.		

Programm:	Denaturierung	95°C	5 min	
	Denaturierung	95°C	45 sec	} 9-11 Zyklen
	Hybridisierung	60°C	3 min	
	Elongation	72°C	4 min	
	Elongation	72°C	10 min	

Die markierten PCR Produkte wurden auf einem 6% Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Dafür wurde die größere Glasplatte vorher mit Binde-Silan-Lösung (5 µl Binde-Silan, 5 µl Essigsäure, 1 ml Ethanol), die kleinere mit Repel-Silan (1 ml) behandelt und nach Anleitung des Herstellers das Gel (60 ml) gegossen. Je 10 µl der Proben wurden mit 14 µl 2x Ladepuffer gemischt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einem Vorlauf (1 h, 85 W) wurden die denaturierten Proben auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese lichtgeschützt mit 1x TGE als Laufpuffer und bei 80 W für ungefähr zwei Stunden durchgeführt. Die Glasplatten wurden voneinander getrennt und das Gel an der Glasplatte haftend direkt am Typhoon Scanner eingescannt.

3.2.9 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Benötigte Lösungen:

Fixation Buffer (FB):	25 ml (500 mM) 1 ml (0.1 M) 100 µl (1 mM) 125 µl (0,5 mM) 15 ml (11%) H ₂ O ad 50 ml.	HEPES/KOH (1M), pH 7.9 NaCl ₂ (5 M) EDTA (0,5 M, pH 8.0) EGTA (0,2 M, pH 8.0) Formaldehyd (37%)
Glycin (20x):	9,85 g (2,625 M) H ₂ O ad 50 ml	Glycin
Cell Buffer Mix (CBM):	556 µl (10 mM) 2,38 ml (85 mM) 111 µl (1 mM) H ₂ O ad 50 ml.	HEPES/KOH (1M), pH 7.9 KCl (3 M) EDTA (0,5 M, pH 8.0)
	Unmittelbar vor Gebrauch zugegeben/ml CBM:	
	10 µl (1 mM)	PMSF (100 mM in Isopropanol)
	1 µl (2 µg/µl)	Aprotinin
	1 µl (1 µg/µl)	Pepstatin
Suspension Buffer (L1A):	900 µl H ₂ O ad 1 ml.	CBM
Suspension Buffer (L1B):	900 µl 100 µl (1%)	CBM NP-40 (10%)

Nuclear Lysis Buffer (L2):	2,5 ml (50 mM) 2,5 ml (1%) 833 µl (0,5%) 1 ml (10 mM) H ₂ O ad 50 ml. Unmittelbar vor Gebrauch zugegeben/ml L2: 10 µl (1 mM) 1 µl (2 µg/µl) 1 µl (1 µg/µl)	Tris/HCl (1M), pH 7.4 bei 20°C SDS (20%) Empigen (30%) EDTA (0,5 M, pH 8.0) PMSF (100 mM in Isopropanol) Aprotinin Pepstatin
Dilution Buffer (DB):	1 ml (20 mM) 1 ml (100 mM) 200 µl (2 mM) 2,5 ml (0,5%) H ₂ O ad 50 ml. Unmittelbar vor Gebrauch zugegeben/ml DB: 1 µl (2 µg/µl) 1 µl (1 µg/µl)	Tris/HCl (1M), pH 7.4 bei 20°C NaCl (5 M) EDTA (0,5 M, pH 8.0) TritonX-100 (10%) Aprotinin Pepstatin
Wash Buffer I (WBI):	1 ml (20 mM) 1,5 ml (150 mM) 250 µl (0,1%) 5 ml (1%) 200 µl (2 mM) H ₂ O ad 50 ml.	Tris/HCl (1 M), pH 7.4 bei 20°C NaCl (5 M) SDS (20%) TritonX-100 (10%) EDTA (0,5 M, pH 8.0)
Wash Buffer II (WBI):	1 ml (20 mM) 5 ml (500 mM) 5 ml (1%) 200 µl (2 mM) H ₂ O ad 50 ml.	Tris/HCl (1 M), pH 7.4 bei 20°C NaCl (5 M) TritonX-100 (10%) EDTA (0,5 M, pH 8.0)
Wash Buffer III (WBIII):	0,5 ml (10 mM) 2,5 ml (250 mM) 5 ml (1%) 5 ml (1%) 100 µl (1 mM) H ₂ O ad 50 ml.	Tris/HCl (1 M), pH 7.4 bei 20°C LiCl (5 M) NP-40 (10%) Deoxycholat (10%) EDTA (0,5 M, pH 8.0)
Elution Buffer (EB):	450 µl (0,1 M) 225 µl (1%) H ₂ O ad 4,5 ml.	NaHCO ₃ (1 M) SDS (20%)
Sepharose CL4B: Protein A/G Sepharose	50 µl pro <i>Preclearing</i> 30 µl pro Präzipitation → vorher 2x mit PBS gewaschen.	

Die Chromatin-Immunpräzipitation stellt eine Methode dar, um *in vivo* gebundenes Kernprotein an definierte DNA-Bereiche nachzuweisen. Dazu wird DNA mit dem daran gebundenen Protein kovalent vernetzt, fragmentiert und mit entsprechenden Antikörpern immunpräzipitiert. Mit genspezifischen Primern wird schließlich die Anreicherung gegenüber einem unspezifischen Antikörper durch quantitative PCR bestimmt.

Pro Ansatz wurden 5×10^6 Zellen in 10 ml Kulturmedium in 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung

mit Formaldehyd durch die Zugabe von 1 ml FB (1/10 Vol) und Inkubation bei RT für 10 Minuten. Überschüssiges Formaldehyd wurde mit 550 µl Glycin (1/20 Vol) inaktiviert und die Zellen dreimal mit PBS/100 mM PMSF gewaschen.

Das Zellpellet wurde mit 250 µl hypotonem Puffer L1A resuspendiert, dann 250 µl L1B dazugegeben, kurz vermischt und 5-10 Minuten auf Eis lysiert. Die Kerne wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C) und in 400 µl L2 aufgenommen. Mittels Ultraschall im Sonicator (Stufe 2, 2x 10 Sekunden, dazwischen auf Eis) wurde die DNA in ca. 500 bp große Fragmente zerkleinert und durch anschließende Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, 4°C) der Zellschrott entfernt. Bevor der Überstand (400 µl) mit 0,6 ml DB verdünnt wurde, wurden 4 µl des Lysats als 5% Input zurückbehalten.

Für jede Präzipitation wurden 200 µl verdünntes Lysat eingesetzt und mit je 0,5 µl BSA (20%), 0,5 µl SSp-DNA (10 µg/µl) und 50 µl CL4B-Sepharose alles zusammen für 2 Stunden bei 4°C rotiert (*Preclearing*).

Danach wurden je 200 µl vom Überstand mit 2,5 µg Antikörper versetzt und über Nacht auf dem Roller bei 4°C inkubiert. Die Gewinnung der präzipitierten Komplexe erfolgte über die Bindung des Fc-Anteils der Antikörper an Protein A/G-Sepharose (Tabelle 3-3): pro Ansatz 30 µl Sepharose plus 0,2 µl SSp-DNA (10 µg/µl).

Tabelle 3-3. Affinität von Protein A/G (Life Science News 12, 2002 Amersham Biosciences)

Spezies	Protein A	Protein G
Kaninchen Antikörper	++++	+++
Ziege Antikörper	-	++
Maus IgG1	+	++++

Nach zweistündiger Rotation bei 4°C wurde die Sepharose-Suspension in Millipore Ultrafree MC Spin Columns aufgefangen (3.000 Upm, 1 min, 4°C), nacheinander mit je 400 µl WB1, WB2, WB3, 1x TE pH 7.5 und 1x TE pH 8.0 gewaschen. Die DNA wurde zweimal mit je 100 µl EB unter erst 20- dann 10-minütiger Inkubation eluiert, wobei die Säulchen alle 5 Minuten aufgeschüttelt wurden. Ebenfalls wurden 200 µl EB zu den Input-DNAs gegeben und alle Proben zur Lösung der kovalenten Bindungen (*Reverse Crosslinking*) auf 65°C erhitzt (mind. 4 Stunden, besser über Nacht). Die präzipitierte freie DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hildesheim) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und in 100 µl EB nach zwei Minuten Inkubation bei RT eluiert. Die quantitative Analyse erfolgte mit Real-time-PCR (3.2.7.2).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultur der Zelllinien

3.3.1.1 Kulturbedingungen und Passagierung

Die verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in RPMI 1640 (PAA) oder DMEM (Gibco) mit folgenden Zusätzen kultiviert (Tabelle 3-4): L-Glutamin (2 mM), 2 ml Vitamine, Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), Natriumpyruvat (1 mM), 2-Mercaptoethanol (50 μ M). Alle Zusätze wurden von Gibco (Eggenstein) bezogen. Dem Medium wurde 10% fötales Kälberserum (FCS), das zuvor bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert wurde, zugesetzt und die Zellen bei 37°C, 5% (RPMI) bzw. 7% (DMEM) CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden adhärente Zellen zur Passage entweder mit einem Zellschaber abgekratzt oder nach Waschen mit PBS mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA für 3-5 Minuten bei 37°C trypsinisiert. Die in Medium plus FCS (zur Inaktivierung von Trypsin) aufgenommenen Zellen wurden 1:3 bis 1:10 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen eingesät.

Tabelle 3-4. Zellkulturbedingungen

Zelllinien	Medium	Passagierung
HT29	DMEM	Trypsin/EDTA
THP1	RPMI	Suspensionszellen
RAW264.7	RPMI	Zellschaber
NIH3T3	DMEM	Trypsin/EDTA
CT26	DMEM	Trypsin/EDTA

Die murine myeloische Progenitorzelllinie PUER (Walsh, J. C. et al. 2002) wurde in 10% FCS/IMDM (Invitrogen, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen kultiviert: L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), 2-Mercaptoethanol (50 μ M), mL-3 (5 ng/ml; Biosource), Puromycin (1 μ g/ml) und zur Differenzierung 4-Hydroxytamoxifen (100 nM; 1mM Stock mit 100% Ethanol).

Die undifferenzierten Zellen sind in Suspension und verdoppeln sich in weniger als 24 Stunden. Die Zelldichte darf zwischen 0,15-1,5 x 10⁶/ml sein. Normalerweise

wurden die Zellen alle drei Tage passagiert und $0,15-0,2 \times 10^6/\text{ml}$ eingesät. Zum Differenzieren wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 8 min, 4°C) und in frischem Medium mit Tamoxifen (OHT) aufgenommen. Für Experimente mit kurzen Zeitpunkten (< 6 Stunden) wurden die Zellen zu $0,8-1 \times 10^6/\text{ml}$ ausgesät, für 24 Stunden zu $0,5-0,7 \times 10^6/\text{ml}$ und für länger zu $0,2-0,4 \times 10^6/\text{ml}$, da sich die Zellen nur während der ersten 24 Stunden nochmal teilen. Nach der Differenzierung werden die Zellen adhärent und wurden für die weitere Verwendung mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche abgelöst.

3.3.1.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Benötigte Lösung:

Trypanblaulösung:	0,2% (w/v) in 0,9%iger	Trypanblau NaCl-Lösung
-------------------	---------------------------	---------------------------

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlußtests bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit der Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellen innerhalb eines Großquadrates (= 16 Kleinquadrate) ausgezählt.

Berechnung der Zellzahl z (Zellen/ml): $z = Z \times V \times 10^6$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm^2)
 V = Verdünnungsfaktor

3.3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfriermedium:	50%	Wachstumsmedium abhängig von Zelllinie
	40%	FCS
	10%	DMSO (Dimethylsulfoxid)

Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz geerntet und $4-8 \times 10^6$ Zellen in 800 µl eiskaltem Medium plus 10% FCS resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt, mit 800 µl FCS/DMSO-Gemisch versetzt und sofort sorgfältig vermischt. Für einen stufenweisen Einfrierprozeß ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) wurden die Zellen in einem Isopropanol gefüllten Cryo-Gefäß (Nalgene) erst für zwei Stunden bei -20°C , dann für 48 Stunden bei -80°C gelagert. Die dauerhafte Aufbewahrung erfolgte in Flüssigstickstoff (-196°C).

Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und sofort nach dem Auftauen in warmes, serumhaltiges Medium aufgenommen, abzentrifugiert (300 g, 8 min, 4°C) und in einer mittleren Zellkulturflasche ausgesät.

3.3.1.4 Nachweis von Mykoplasmen

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenkontamination untersucht. Der Nachweis wurde über einen ELISA mit einem Mycoplasma Detection Kit (Roche, Mannheim) oder biochemischen mit einem MycoAlert® Mycoplasma Detection Assay (Cambrex, Rockland USA) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.2 Humane Monozytenisolierung durch Gegenstromelutriation

Benötigte Lösungen und Chemikalien:

Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg)

PBS

PBS/6% H₂O₂

HANKS (Balanced Salt Solution mit 6% autologem Plasma)

Freiwilligen, gesunden Spendern wurde mittels einer Leukapherese ein Leukozyten-angereichertes Blutkonzentrat abgenommen (Graw, R. G., Jr. et al. 1971). Die mononukleären Zellen (MNC) wurden durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque aus dem Konzentrat isoliert und dreimal mit PBS gewaschen (Johnson, W. D., Jr. et al. 1977). Die Isolierung von Monozyten aus dem MNC-Gemisch erfolgte anschließend über eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) (Sanderson, R. J. et al. 1977).

Tabelle 3-5. Elutriationsschema

Fraktion	Durchflussrate Pumpe ml/min	Hauptanteil an Zellen in der Fraktion
1a	52	Thrombozyten
1b	57	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">kleine</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em;">}</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">Lymphozyten (T- und B-Zellen)</div> </div>
2a	64	
2b	74	
2c	92	
3	111	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">große</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em;">}</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">Monozyten</div> </div>

Die Elutriation erfolgte mit einer Beckman-Zentrifuge (J6-MC) in einer 50 ml Kammer. Die Anlage wurde mit einer 6%igen Wasserstoffperoxidlösung sterilisiert und zweimal für je 20 Minuten mit PBS gespült.

Bei konstanter Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2.500 Upm bei 4°C wurde die Pumpe geeicht und bei einer Durchflussrate von 52 ml/min mit den MNC beschickt. Der Zulauf von HANKS wurde kontinuierlich fortgesetzt und die Durchflussrate stufenweise gesteigert. Nacheinander wurden die Fraktionen abgesammelt (Tabelle 3-5) und die Monozyten als größte Zellen innerhalb der MNC-Population, in der letzten Fraktion 3 abgesammelt. Der Anteil an CD14-positiven Zellen (Monozyten) in dieser Fraktion wurde durch Durchflußzytometrie bestimmt. Die Reinheit der Monozyten-Fraktion lag bei 85-95%.

Die Monozyten wurden bei 1.200 Upm abzentrifugiert, in Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Ausbeute an Monozyten war spenderabhängig und lag zwischen 10-30% bezogen auf die Gesamtzahl der in der Elutriation eingesetzten MNC.

3.3.3 Kultivierung von humanen Monozyten

Um Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung in Makrophagen zu erhalten, wurden diese in hydrophoben Teflonbeuteln kultiviert. Sie wurden mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 mit niedrigem Endotoxingehalt und 2% AB-Serum unter Standardkulturbedingungen gehalten. Nach der jeweiligen Kulturperiode wurde die Morphologie der Zellen im Beutel unter dem Mikroskop begutachtet. Zum Ablösen der Zellen wurden sie für 45 Minuten in den Kühlschrank gelegt. Die abgelösten Zellen wurden geerntet, die Zellzahl bestimmt und für weitergehende Experimente eingesetzt (Andreessen, R. et al. 1983).

War die Ablösung von vitalen Monozyten/Makrophagen für weitere Experimente nicht notwendig, wurden die Zellen von vornherein in große Plastikschränke ausgesät.

Zur Generierung von dendritenähnlichen Zellen wurden Monozyten mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen kultiviert: FCS (10%), rGM-CSF (100 U/ml) und rIL-4 (50 U/ml). Nach 2 bzw. 5 Tagen wurde Medium nachgegeben (je 10 ml bei 25 ml Startkultur) und nach 10 Tagen die

Zellen geerntet. Ein Großteil der Zellen befindet sich in Suspension und zeigt ein typisch verzweigt-polymorphes Aussehen (Xu, H. et al. 1995).

3.3.4 Gewinnung und Kultivierung von murinen Knochenmarkmakrophagen

Primäre Zellen wurden aus den Ober- und Unterschenkelknochen (Femur und Tibia) von 8-10 Wochen alten Mäusen gewonnen. Dazu wurden die jeweiligen Knochen aus der Maus im intakten Zustand herausoperiert, unter sterilen Bedingungen die beiden Knochenenden abgeschnitten und mit einer 0,4x19 mm Kanüle mit eiskaltem PBS von beiden Richtungen gespült. Nach dem Abzentrifugieren (300 g, 8 min, 4°C) wurden die Knochenmarkmakrophagen (BMM) in 10% FCS/RPMI mit allen Zusätzen (siehe Kapitel 3.3.1.1) plus rCSF (200 ng/ml; Cetus) zu $0,5 \times 10^6$ /ml in quadratischen Gewebekulturschalen (Sterilin, U.K.) kultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und am 6. Tag wurden 10×10^6 BMM in 20 ml für weitere Experimente in 10 cm Gewebekulturschalen ausgesät (Ross, I. L. et al. 1998).

3.3.5 Gewinnung von Darmepithelzellen

3.3.5.1 Humane Darmepithelzellen

Die Patientenproben stammten von freiwilligen Spendern, die sich aufgrund eines Karzinoms einer Operation unterziehen mussten. Die Darmstücke, die von der Morphologie einem gesunden Spender entsprachen, wurden in PBS gewaschen, das Epithel vom Muskel getrennt und Blutgefäße und Fett so gut wie möglich entfernt. Zur Entfernung der zähen Mucosa wurden die Stücke in 1 mM DTT/PBS bei 37°C für 15 Minuten geschüttelt, der Vorgang wiederholt und zum Lockern des Epithels schließlich in 2 mM EDTA/PBS bei 37°C für 10 Minuten am Schüttler inkubiert. In 10 ml frischem PBS wurde das Epithelstück für ca. 20 Sekunden gevortext, die abgelösten Krypten setzten sich nach nur wenigen Minuten als Zellpellet ab. Diese Epithelzellen wurden zur weiteren RNA-Präparation eingesetzt (Kießling, S. et al. 2004)

3.3.5.2 Murine Epithelzellen

Für die Gewinnung von murinen IEC (Intestinal Epithelial Cells) wurde den Mäusen der Dünndarm entfernt und sorgfältig mit kaltem PBS gewaschen. Zur Entfernung der epithelialen Schicht wurde der Darm für 10 Minuten bei 37°C in 30 mM EDTA/PBS inkubiert. Durch Vortexen wurden die Epithelzellen abgelöst und konnten durch eine wiederholte differentielle Sedimentation (1 g) getrennt von kontaminierenden Zellen und Geweben gesammelt werden (Lotz, M. et al. 2006).

3.3.6 Transiente Transfektion von Zelllinien

3.3.6.1 Transfektion mit Lipofectamine

RAW264.7 Zellen wurden mit Lipofectamine™2000 im 6-Loch Format transfiziert. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/Loch ohne Penicillin/Streptomycin am Tag vor dem Experiment ausgesät. Nach Anleitung des Herstellers wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung A: 3 µg DNA + 100 µl Optimem

Lösung B: 7 µl Lipofectamine + 100 µl Optimem

Lösung A und B wurden vermischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in der Zwischenzeit mit PBS gewaschen, in 1,8 ml Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und die DNA-Lipofectamine Komplexe tröpfchenweise dazugegeben. Zur Normalisierung wurden je 100 ng Renilla-Reporterplasmid kotransfiziert und für Überexpressionsstudien je 2 µg Reporterplasmid und 2 µg Expressionsplasmid eingesetzt.

3.3.6.2 Transfektion mit Effectene

Für die Transfektion von NIH3T3 und CT26 Zellen für Reporteranalysen wurde Effectene™ (Qiagen), ein kationisches Lipid-Transfektionsreagenz, nach Angaben des Herstellers benutzt. Am Vortag wurden je $0,2 \times 10^6$ Zellen in 12-Loch Platten ausgesät. Für das Experiment wurde 0,3 µg DNA in 75 µl Puffer EC verdünnt, 2,4 µl Enhancer dazugegeben und kurz gevortext. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden 6 µl Effectene dazupipettiert und nochmals 10 Minuten stehengelassen. Nach Zugabe von 400 µl Kulturmedium wurde die Mischung

langsam auf die Zellen, die mit PBS gewaschen und in 800 µl Medium aufgenommen wurden, getropft. Zur Normalisierung wurden 10 ng Renilla-Reporterplasmid kotransfiziert. Für Überexpressionsanalysen wurden 0,2 µg Reporter-DNA und 0,2 µg Expressionsplasmid eingesetzt.

3.3.6.3 Luziferase Reporter Assay

Die Luziferase-Aktivitätsmessung erfolgte mit dem Dual Luziferase Reporter Kit und wurde nach Anleitung von Promega durchgeführt. Die Zellen wurden entweder mit 300 µl (6-Loch Platten) oder 150 µl (12-Loch Platten) Lysepuffer bei RT aufgeschlossen, der Zellschrott abzentrifugiert und das Proteinlysate sofort im Luminometer (Berthold, Kanada) vermessen.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Anleitung zur Kernextraktion

Diese Anleitung zur Herstellung von Kernextrakten wurde modifiziert nach der Methode von Osborn et al. (Osborn, L. et al. 1989). Dabei werden die Zellen zuerst in einem hypotonen Puffer durch Osmose aufgebläht und dann durch Zugabe von einem schwachen Detergenz zum Platzen gebracht, wobei die Kerne intakt bleiben. Anschließend wird in einem hypertonen Puffer und durch zusätzliche Zentrifugationskraft alles lösliche nukleäre Protein aus dem Kern extrahiert.

Reagenzien (Frisch zubereitet und eiskalt):

Puffer A (hypoton)	100 µl (10 mM)	HEPES (1 M, KOH pH 7.9, 4°C)
	15 µl (1,5 mM)	MgCl ₂ (1 M)
	100 µl (10 mM)	KCl ₂ (2 M)
	50 µl (0,5 mM)	DTT (100 mM)
	100 µl (1,0 mM)	PMSF (100 mM)
	10 µl (2 µg/ml)	Aprotinin (2 µg/µl)
	25 µl (2,5 µg/ml)	Leupeptin (1 µg/µl)
	10 µl (1 µg/ml)	Pepstatin (1 µg/µl)
	5 µl (10 µg/ml)	E46 (20 µg/µl)
	10 µl (20 µg/ml)	Antipain (20 µg/µl)
	40 µl (80 µg/ml)	Chymostatin (20 µg/µl in DMSO)
	100 µl (1 mM)	Sodium o-vanadate (100 mM)
	H ₂ O ad 10 ml.	
	(Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden kurz vorher zugegeben.)	

Puffer B		Puffer A	0,5% NP40
Puffer C	20 µl	(20 mM)	HEPES (1 M, KOH pH 7.9, 4°C)
	1,5 µl	(1,5 mM)	MgCl ₂ (1 M)
	84 µl	(420 mM)	NaCl ₂ (5 M)
	310 µl	(25%)	Glycerol (80%)
	0,4 µl	(0,2 mM)	EDTA (0,5 M, pH 8.0)
	5 µl	(0,5 mM)	DTT (100 mM)
	10 µl	(1,0 mM)	PMSF (100 mM)
	1 µl	(2 µg/ml)	Aprotinin (2 µg/µl)
	5 µl	(5 µg/ml)	Leupeptin (1 µg/µl)
	1 µl	(1 µg/ml)	Pepstatin (1 µg/µl)
	1 µl	(20 µg/ml)	E46 (20 µg/µl)
	2,5 µl	(50 µg/ml)	Antipain (20 µg/µl)
	8 µl	(160 µg/ml)	Chymostatin (20 µg/µl in DMSO)
	5 µl	(0,5 mg/ml)	Pefabloc SC (100 µg/µl)
	10 µl	(1 mM)	Sodium o-vanadate (100 mM)
	H ₂ O ad 1 ml.		
	(Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden kurz vorher zugegeben.)		

Die Zellen wurden geerntet (300 g, 8 min, 4°C), dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und zu 10-20 x 10⁶/ml in Puffer A resuspendiert und je 1 ml in Eppendorf Gefäße aufgeteilt. Nach der Schwellung auf Eis für drei Minuten wurden die Zellen in einer gekühlten Mikrozentrifuge (400 g, 6 min, -9°C) pelletiert und in 150-200 µl Puffer A mit einer Pipette resuspendiert. Die gleiche Menge an Puffer B wurde zugegeben, sofort für eine Sekunde bei 1.400 Upm gevortext und 5-15 Minuten auf Eis inkubiert. Sobald die Mehrzahl der Kerne freigesetzt waren (mikroskopische Kontrolle), wurden diese pelletiert (600 g, 6 min, -9°C) und wenn nötig mit 300-500 µl Puffer A gewaschen. Nachdem der Überstand abgenommen war, wurden je nach Kernpellet 30-60 µl Puffer C zugegeben, die Kerne durch Anschnipsen vollständig resuspendiert und auf Eis für 8 Minuten inkubiert. Die Kernsuspension wurde zentrifugiert (16.000 g, 10 min, -9°C) und der Überstand, der den Kernextrakt darstellt, portionsweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.4.2 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Benötigte Puffer und Lösungen:

10x Bindepuffer:	20 µl	(200 mM)	HEPES (1 M, KOH pH 7.9, 4°C)
(Frisch zubereitet)	2 µl	(20 mM)	MgCl ₂ (1 M)
	30 µl	(600 mM)	KCl (2 M)
	10 µl	(100 mM)	DTT (Frisch zubereitet)
	2 µl	(10 mM)	0,5 M EDTA, pH 8.0
	H ₂ O ad 100 µl (36 µl).		
10x TGE:	15,14 g	(250 mM)	Tris
(pH 8.3)	72,07 g	(1,92 M)	Glycin

Elektrophorese Puffer	2 ml H ₂ O ad 500 ml.	(2 mM)	0,5 M EDTA, pH 8.0
Nukleotid Mix:	1 µl each 97 µl	(1 mM each)	dNTP-dXTP (100 mM) H ₂ O
dXTP(α - ³² P) Poly (dl-dC)	50 µCi	(3000 µCi/mmol) Poly (dl-dC)	Amersham, Braunschweig (1 µg/µl)

Im EMSA werden Protein-DNA Interaktionen mit einer nativen Polyacrylamid-Elektrophorese *in vitro* nachgewiesen. Das Prinzip dabei ist, dass freie DNA im Vergleich zu einem Protein-DNA Komplex ein verändertes Laufverhalten zeigt.

Dafür wurden durch die Hybridisierung von komplementären, synthetischen Oligonukleotiden doppelsträngige DNA-Proben mit 3-6 Nukleotiden 5'-Überhängen hergestellt, die anschließend für das Labeling in einer Klenow-Reaktion mit einem radioaktiv markierten dXTP (ein oder mehrere Basen pro Überhang) aufgefüllt wurden. Für den Beweis einer spezifischen Bindung wurde kalte Kompetitor-DNA hergestellt, indem *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide der analysierten DNA-Sequenz auf die gleiche Weise hybridisiert wurden.

DNA-Proben: 5 µl *Sense* Oligo (100 µM)
5 pmol/µl 5 µl *Antisense* Oligo (100 µM)
90 µl H₂O
→ 80-95°C (10-15°C über dem kalkulierten Schmelzpunkt), 10 min
Zum langsamen Abkühlen auf RT stehengelassen (ca. 1 h).

Labeling Reaktion: 2 µl Klenow Puffer (10x)
1 µl (5 pmol) dsOligo (5 pmol/µl)
1 µl dNTP (ohne α -[³²P]-dXTP), each 1 mM
10 µl H₂O
5 µl (50 µCi) α -[³²P]-dXTP (3000 µCi/mmol)
1 µl (2 U) Klenow-Polymerase
→ 1 h, 37°C

Die Aufreinigung der Sonde erfolgte nach Zugabe von 30 µl 1x TE (pH 8.0) über ein MicroSpin™ G-25 Säulchen nach dem Größenausschlußprinzip gemäß Anleitung des Herstellers.

Die Polyacrylamidgele wurden mindestens zwei Stunden vor dem Lauf gegossen (Tabelle 3-6). Verschiedene PAA Konzentrationen und das Puffersystem mit Tris Puffer im Gel und 1x TGE als Elektrophoresepuffer sorgte für maximale Auflösung.

Tabelle 3-6. Polyacrylamidgel 15 ml/Gel

	6%	6,5%	7%	7,5%	8%	8,5%	9%
10x Gelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Acrylamid 40%	2,3 ml	2,4 ml	2,6 ml	2,8 ml	3 ml	3,2 ml	3,4 ml
H ₂ O	11,1 ml	11 ml	10,8 ml	10,6 ml	10,4 ml	10,2 ml	10 ml
APS (10%)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Cocktail (für 1 Ansatz):

1,5 µl	(12%)	Glycerin (80%)
1 µl	(1 x)	10x Bindepuffer
0,5 µl	(0,05 µg/µl)	Poly (dl-dC) (1 µg/µl)
1 µl		Gelabelte Sonde
4 µl		H ₂ O

Leerpuffer:

10 µl	10x Bindepuffer
15 µl	Glycerin
75 µl	H ₂ O

Blaumarker:

8 µl	Leerpuffer
2 µl	Bromphenolblau (0,02%)

In die vorbereiteten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde H₂O oder kalte Kompetitor-DNA vorgelegt (Tabelle 3-7), im Isotopenlabor der Cocktail dazugegeben und der Kernextrakt mit der Pipettenspitze eingerührt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde schließlich der Antikörper hinzugefügt und nochmals für 10-15 Minuten inkubiert.

Tabelle 3-7. Pipettierschema für EMSA

	Cocktail	Kernextrakt	Kompetitor	Antikörper	H ₂ O
1	8 µl				2 µl
2	8 µl	1 µl			1 µl
3	8 µl	1 µl	1 µl		
4	8 µl	1 µl		1 µl	
5	Blaumarker				

Die Proben wurden in die Taschen geladen und die Elektrophorese mit 1x TGE als Elektrodenlaufpuffer bei 130 V und 25 mA pro Gel für ca. 2,5 Stunden durchgeführt, bis der Blaumarker das untere Ende erreicht hatte. Das Gel wurde herausgenommen, in 5% Essigsäure für 10 Minuten fixiert und auf Whatman-Filterpapier im Vakuum-Trockner eine Stunde bei 80°C getrocknet. Die Detektion erfolgte mit Europium-beschichteten ³²P-sensitiven Screens am Phosphorimager®.

4. Ergebnisse

4.1 Toll-like Rezeptor 4 (*TLR4*) mRNA Expression und Spleißverhalten in Mensch und Maus

Neuere Daten zu TLRs haben gezeigt, dass diese wichtigen Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr bei Wirbeltieren zwar hochkonserviert sind, die Transkription der orthologen Rezeptoren zwischen Mensch und Maus aber unterschiedlich reguliert ist (Rehli, M. 2002). Die TLRs verschiedener Spezies können sich in ihrer Zelltyp-spezifischen Regulation oder ihrer Induzierbarkeit unterscheiden. Die Gene *TLR2* und *TLR3* wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits gut untersucht. Spezies-spezifische Unterschiede in ihrer transkriptionellen Regulation sind sehr wahrscheinlich auf nicht-konservierte Promotoren zurückzuführen (Haehnel, V. et al. 2002, Heinz, S. et al. 2003). Auch vom *TLR4* Gen, dessen proximaler Promotor zwischen Mensch und Maus stark konserviert ist, waren bereits Regulationsunterschiede bekannt. Ein Beispiel hierfür ist die Abnahme des *Tlr4* Transkripts nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in der Maus (Matsuguchi, T. et al. 2000a, Tsatsanis, C. et al. 2006), im Gegensatz zur Hochregulation der *TLR4* Expression beim Menschen (Muzio, M. et al. 2000). Um diese Spezies-spezifischen Unterschiede genauer untersuchen zu können, sollte zunächst die *TLR4* Expression in humanen und murinen Zellen und innerhalb verschiedener Zelltypen verglichen werden.

4.1.1 Spleißen als Regulationsmechanismus der *TLR4* Expression

In beiden Spezies wurde die höchste *TLR4* Expression in myeloischen Zellen (Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten) beschrieben (Hornung, V. et al. 2002, Lehnardt, S. et al. 2002, Muzio, M. et al. 2000). Aber auch B-Zellen und Epithelzellen exprimieren *TLR4* in geringeren Mengen (Backhed, F. and Hornef, M. 2003, Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. 2002). Um das Spleißverhalten zu untersuchen, wurden Spezies-spezifische Primer verwendet, die jeweils das erste und letzte Exon umspannen, da bereits in beiden Spezies mehrere Spleißformen beschrieben wurden. Die RT-PCR Analyse unterschiedlicher Zelltypen in Abbildung 4-1 zeigt, dass alle humanen Zellen

myeloischen Ursprungs (THP1 und Monozyten (Mo)) *TLR4* mRNA exprimierten. Bei den beiden nicht-myeloischen Kolonkarzinom Zelllinien konnte nur in den HT29 Zellen, nicht aber in den CaCo Zellen *TLR4* mRNA nachgewiesen werden. Wie für den humanen *TLR4* bereits gezeigt wurde (Rehli, M. et al. 2000), konnten drei mRNA-Varianten detektiert werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. Nur das mittlere Transkript bestehend aus Exon I, III und IV ergibt ein funktionelles Protein. Es konnte beobachtet werden, dass sich bereits zu Beginn der Adhärenz der Zellen das Spleißmuster zu vermehrter Bildung des mittleren, funktionellen Transkripts verschiebt (Mo → Mo 3 h, Mo 24 h). Beim Vergleich der Transkripte von Monozyten mit und ohne LPS-Stimulierung (Mo 3 h → Mo 3 h LPS) konnte eine Hochregulation des *TLR4* Transkripts nach LPS Stimulation bestätigt werden, jedoch war der nach drei Stunden gemessene Effekt nur kurzfristig und nach 24 Stunden war der *TLR4* mRNA Spiegel sogar geringer als bei nicht stimulierten Zellen (PCR mit gleicher Zyklenzahl nicht gezeigt).

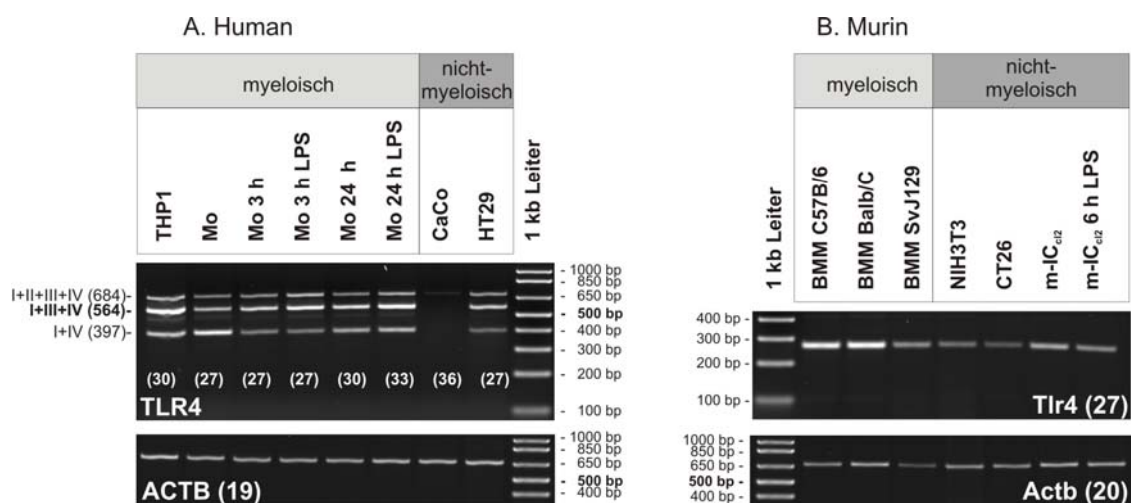


Abbildung 4-1. Analyse der mRNA des humanen bzw. murinen *TLR4*

RT-PCR Analysen mit Exon I und Exon IV umspannenden Primern zeigen *TLR4* Expression und verschiedene Spleißvarianten in primären Zellen und Zelllinien. A. Darstellung der humanen *TLR4* Transkripte in myeloischen (THP1: Monozyten, primäre Monozyten (Mo) während Adhärenz nach 3 h und 24 h ± Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)) und nicht-myeloischen Zellen (CaCo und HT29: Kolonkarzinom). Die Rezeptor-kodierende mRNA von *TLR4* besteht aus Exon I, III und IV und ist fettgedruckt. B. Ergebnisse der RT-PCR Analyse der *Tlr4* Expression in murinen myeloischen BMM aus C57B/6, Balb/c und SvJ129 Mausstämmen) und nicht-myeloischen (NIH3T3 Fibroblasten, CT26 Kolonkarzinom und m-IC_{cl2} Darmepithelzellen ± Stimulation mit LPS) Zellen. Die unterschiedliche Anzahl der PCR-Zyklen ist jeweils in Klammern angegeben und zur Ladungskontrolle wurde das Haushaltsgen *ACTB* (β-Aktin) amplifiziert.

Abbildung 4-1.B zeigt die *Tlr4* mRNA Expression in murinen Zellen, wobei in den myeloischen Zellen (Knochenmarkmakrophagen (BMM) der Mausstämmen

C57B/6, Balb/c und SvJ129) *Tlr4* deutlich stärker transkribiert wurde als in den nicht-myeloischen Zellen (NIH3T3 Fibroblasten, CT26 Kolonkarzinom und m-IC_{cl2} Darmepithelzellen). Im Widerspruch zur Literatur, laut der auch *Tlr4* Spleißvarianten in der Maus vorkommen (Iwami, K. I. et al. 2000, Matsuguchi, T. et al. 2000a), wurde in allen auf *Tlr4* Transkription untersuchten murinen Zellen nur eine Spleißform der *Tlr4* mRNA nachgewiesen. Nicht zuletzt konnte gezeigt werden, dass 6 Stunden nach Stimulation der murinen intestinalen Epithelzellen mit LPS die mRNA Expression des *Tlr4* herunterreguliert wurde (m-IC_{cl2} → m-IC_{cl2} 6 h LPS), im Gegensatz zu humanen Epithelzelllinien, in denen ein gleichbleibender mRNA Spiegel beschrieben wurde (Otte, J. M. et al. 2004). Durch das alternative Spleißen der transkribierten RNA hat der Mensch gegenüber der Maus einen weiteren Mechanismus der *TLR4* Regulation erworben.

4.1.2 Spezies-spezifische *TLR4* Regulation in alternativ aktivierten Makrophagen

Wie bereits erwähnt, ist die Spezies-spezifische *TLR4* Regulation nach LPS-Stimulation in Makrophagen bereits gut untersucht. Über den humanen *TLR4* ist auch bekannt, dass er in alternativ aktivierten Makrophagen durch IL-4, ein anti-inflammatorisches Zytokin das während der T_H2-Immunantwort produziert wird, reguliert wird (Staeger, H. et al. 2000). Im direkten Vergleich wurde die IL-4-abhängige Expression in Mensch und Maus untersucht.

Dazu wurde RNA von humanen Monozyten und murinen Makrophagen jeweils 4 und 24 Stunden nach IL-4 Stimulation präpariert und die *TLR4* Expression mit Real-time-PCR quantifiziert (Abbildung 4-2). Zu beiden Zeitpunkten wurde in den humanen Zellen eine 50%ige Herunterregulation der *TLR4* Transkription im Vergleich zu den unstimulierten Zellen gemessen. Im Gegensatz dazu wurde 24 Stunden nach der IL-4 Zugabe eine dreifach erhöhte *Tlr4* Expression bei BMM aus den Stämmen Balb/c und SvJ129 (nicht gezeigt) beobachtet. Zum Vergleich ist die Expression des *TLR2* ebenfalls in Abbildung 4-2 gezeigt. Die Transkription des *TLR2* Gens nahm in Anwesenheit von IL-4 bei beiden Spezies bereits nach 4 Stunden ab und zeigte im Unterschied zum *TLR4* eine ähnliche Regulation in Mensch und Maus.

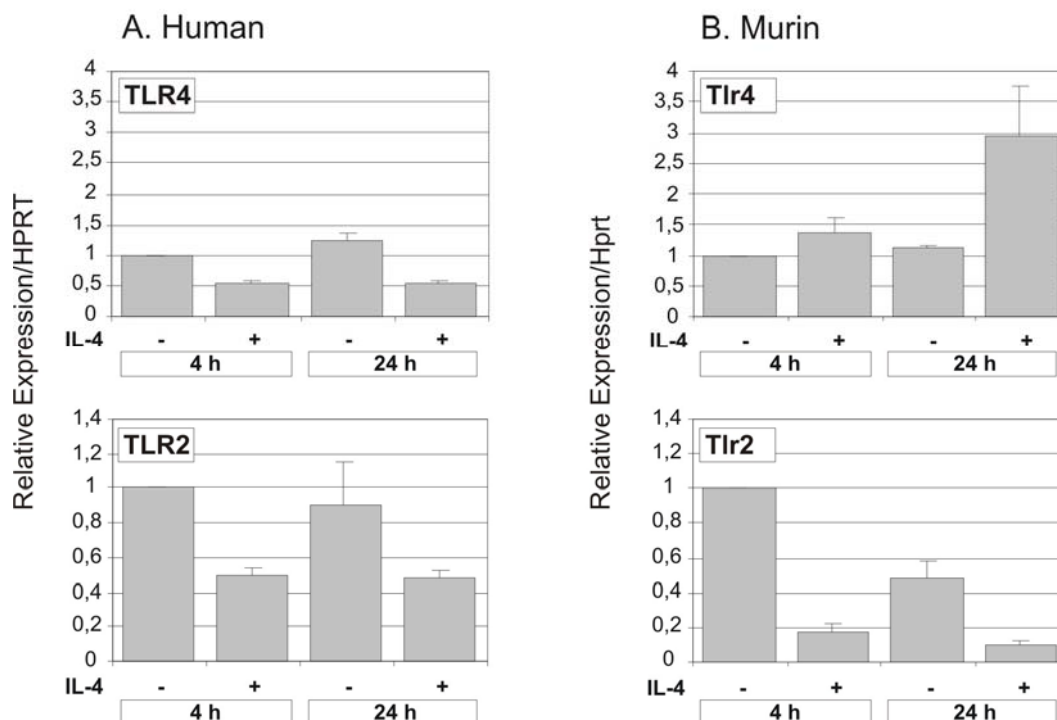


Abbildung 4-2. Interleukin 4-abhängige mRNA Expression von *TLR2* und *TLR4*

Humane Monozyten (A) und BMM aus Balb/c Mäusen (B) wurden mit 40 ng/ml IL-4 stimuliert und nach 4 und 24 Stunden von den Zellen RNA präpariert. Die Quantifizierung der *TLR4* und *TLR2* mRNA Spiegel wurde mit Real-Time-PCR durchgeführt. Die *HPRT* Expression wurde auf die gleiche Weise gemessen, die TLR-Werte wurden darauf normalisiert und sind jeweils relativ zur unstimulierten 4 h-Probe angegeben. Alle Real-time-PCR Werte + SD stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3 Spezies-spezifische *TLR4* Regulation in epithelialen Zelllinien

Bisher sind TLRs in Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) am Besten untersucht. In neueren Untersuchungen, einschließlich der Expressionsanalyse in Kapitel 4.1.1, wurde aber auch eine *TLR4* Expression in Epithelzellen nachgewiesen (Backhed, F. and Hornef, M. 2003). Über die Regulation von TLRs in epithelialen Zellen des Menschen ist bereits einiges bekannt (Abreu, M. T. et al. 2002, Mueller, T. et al. 2006, Otte, J. M. et al. 2004), dagegen gibt es darüber noch wenige Daten zu den entsprechenden Zellen der Maus.

Deshalb wurden die murine (CT26) und humane (HT29) epithelialen Zelllinien (Kolonkarzinom), die beide *TLR4* exprimieren (Abbildung 4-1), verwendet und die Spezies-spezifische Regulation der *TLR4* Expression unter der Einwirkung von Zytokinen und LPS untersucht (Abbildung 4-3). Die Zellen wurden einerseits mit IL-4, ein Zytokin zur Induktion einer T_H2 -Immunantwort, und mit den T_H1 -Antwort

induzierenden Molekülen IL-1 β , TNF α , IFN γ oder LPS stimuliert. Die RNA wurde nach 4 und 24 Stunden präpariert.

In der murinen Zelllinie CT26 (Abbildung 4-3.A) konnte nach 24 Stunden bereits ohne Stimulus eine dreifache Hochregulation der *Tlr4* mRNA festgestellt werden. Jedoch zeigte die Stimulation mit keinem der getesteten immunmodulatorischen Zytokinen oder LPS einen Einfluss auf die Transkription von *Tlr4*. Waren die Zellen aber mit IFN γ vorbehandelt (Zugabe von IFN γ 14 h vor eigentlicher Stimulation), führte die Stimulation mit LPS zu einer Verdoppelung der *Tlr4* mRNA Expression.

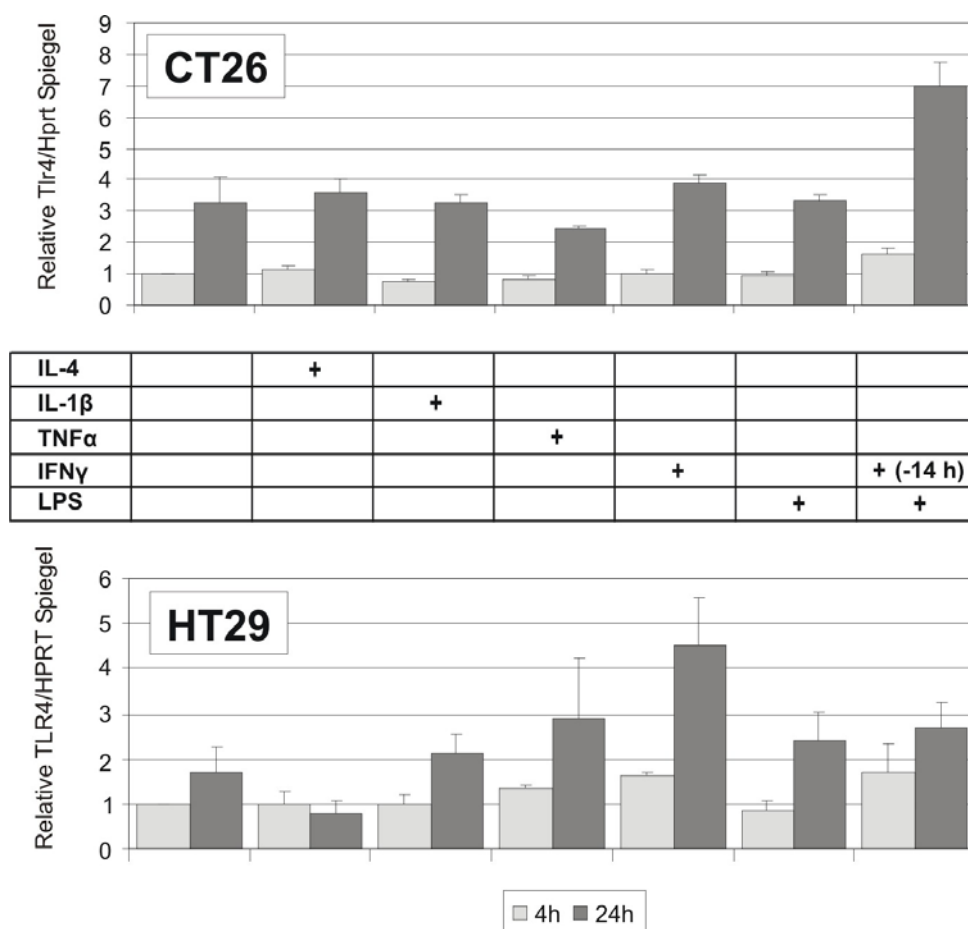


Abbildung 4-3. Regulation der *TLR4* mRNA nach Stimulation mit Zytokinen und LPS in IEC

Murine (CT26) und humane (HT29) epitheliale Zelllinien wurden mit murinem bzw. humanem IL-4 (50 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) oder IFN γ (50 ng/ml) behandelt. Beide Zelllinien wurden mit humanem TNF α (50 ng/ml) und LPS (10 ng/ml) stimuliert. Für die Vorstimulation mit IFN γ wurde dieses 14 Stunden vor der LPS Zugabe in den angegebenen Konzentrationen ins Medium gegeben. Nach der RT-PCR wurde die *TLR4* mRNA mit einer Real-time-PCR quantifiziert und mit der *HPRT* Expression normalisiert. Alle Real-time-PCR Werte \pm SD wurden aus mindestens drei Experimenten errechnet und sind relativ zu den unstimulierten Zellen zum Zeitpunkt 4 h.

Die humanen Epithelzellen (Abbildung 4-3.B) HT29 unterschieden sich von den murinen Zellen in einigen Punkten. Erstens war der *TLR4* mRNA Spiegel in der Zellkultur stabiler und nach 24 Stunden wurde ohne Stimulierung lediglich ein minimaler Anstieg der mRNA gemessen. Zweitens hatten die Zytokine unterschiedliche Einflüsse auf die *TLR4* Expression. So führte IL-4, wie auch bei humanen Monozyten (Abbildung 4-1), zu einer abnehmenden *TLR4* Expression. Während nach Zugabe von IL-1 β und LPS keine signifikante Änderung der mRNA Spiegel meßbar waren, führten TNF α und besonders IFN γ zu einer Erhöhung der Expression. Im Gegensatz zu den murinen Zellen hatte LPS in IFN γ -vorstimulierten Zellen einen reprimierenden Einfluss auf die *TLR4* Expression. Zusammenfassend deuten die beobachteten Spezies-spezifischen Unterschiede in der *TLR4* Expression auf evolutionsbedingte Veränderungen in der Regulation hin. Viel ist schon über die Ligandenspezifität und Signaltransduktion der TLRs bekannt, aber noch wenig über ihre Transkription. Ein Hauptziel dieser Arbeit war es deshalb, die Mechanismen der *TLR4* Transkription in Mensch und Maus genauer zu untersuchen.

4.2 Transkriptionelle Regulation des *TLR4* Gens auf Promotorebene

Der humane *TLR4* Promotor und seine Regulation in Makrophagen wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Durch gerichtete Mutagenese konnte durch Reporteranalysen ein IRF (Interferon Regulatory Factor)-Motiv und zwei Ets (E26 transformation specific)-Elemente für die *TLR4* Reporteraktivität verantwortlich gemacht werden (Rehli, M. et al. 2000). Ein Sequenzvergleich mit dem murinen *Tlr4* Promotor zeigte eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen den Promotorsequenzen der beiden Spezies (61 %). Inzwischen wurden auch Daten einer anderen Arbeitsgruppe bekannt, die durch ähnliche Reporterassays den minimalen orthologen *Tlr4* Promotor in der Maus charakterisieren konnten. Die Mutationen von zwei Ets-Motiven und einer AP1-Bindestelle führten zu einem Verlust der Reporteraktivität, während die mutierten GATA- und Octamer-Motive eine Aktivitätszunahme bewirkten (Roger, T. et al. 2005). Zur Übersicht sind die bereits vorhandenen Daten aus der Literatur in Abbildung 4-4 schematisch dargestellt.

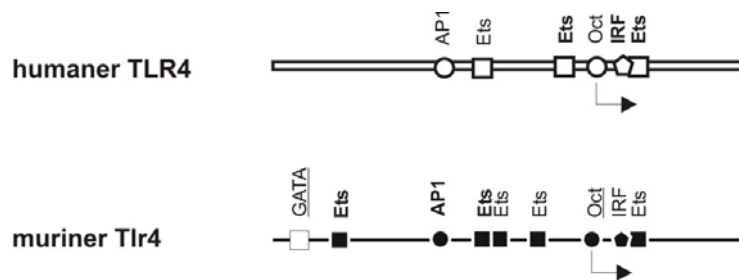


Abbildung 4-4. Übersichtsdarstellung der *TLR4* Promotoren in Mensch und Maus

Der humane und der murine proximale *TLR4* Promotor sind im Vergleich schematisch dargestellt. Konserviert sind mehrere Ets-Motive, eine IRF (Interferon Regulatory Factor)-, Octamer (Oct)- und AP1-Bindestelle. DNA-Elemente, die laut Literatur in Reporterassays für eine maximale Aktivität wichtig waren, sind fettgedruckt und Motive, die einen negativen Effekt auf die Regulation zeigten, sind unterstrichen. Publierte Transkriptionsstartpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach (Roger, T. et al. 2005)

Im Gegensatz zu den nicht-konservierten *TLR2* und *TLR3* Promotoren, die unterschiedliche Regulationsmechanismen aufweisen (Haehnel, V. et al. 2002, Heinz, S. et al. 2003), könnten also nur minimale Unterschiede, die sich während der Evolution im ansonsten hoch konservierten *TLR4* Promotor durchgesetzt haben, zu einer Spezies-spezifischen Regulation führen.

4.2.1 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte (TSSs) des *TLR4* Promotors: Definition eines alternativen Promotors in nicht-myeloischen Zellen

Bisher waren nur die TSSs in humanen Makrophagen bekannt (Rehli, M. et al. 2000) und da *TLR4* auch in epithelialen Zellen und Fibroblasten detektiert wurde, sollten die TSSs in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen mit einer speziellen 5'-RLM-RACE-PCR bestimmt werden. Nach einer Linker-Ligation an ausschließlich vollständige Transkripte wurden unter Verwendung von Linker- und Gen-spezifischen Primern die exakten 5'-Enden der mRNAs amplifiziert und anschließend sequenziert. In Abbildung 4-9 sind die Ergebnisse der RACE-PCR Analyse von sowohl primären Zellen als auch entsprechenden Zelllinien von Mensch und Maus dargestellt. Es zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung der TSSs, wobei interessanterweise bei der Maus die Initiation der *Tlr4* Transkription abhängig vom Zelltyp war. Während in BMM (C57B/6 und BALB/c) zwei TSSs stromabwärts der PU.1_1-Bindestelle gefunden wurden, liegt der TSS aller

nicht-myeloischen Zellen (CT26, m-IC_{c12}, NIH3T3 und intestinale Epithelzellen (IEC) aus C57B/6 Mäusen) ca. 200 bp stromaufwärts. In der RAW264.7 Zelllinie wurde zusätzlich zu den Makrophagen-typischen proximalen TSSs der eigentlich nicht-myeloische distale TSS benutzt. Im Gegensatz dazu liegt beim Menschen sowohl bei den myeloischen (Mono und THP-1) als auch nicht-myeloischen (primäre IEC und HT29) Zellen ein Hauptstart vor, der dem schwächeren der zwei proximalen TSSs der Maus entspricht. Nur ein sehr geringer Teil der Transkripte bei den nicht-myeloischen Epithelzellen entsprechen dem distalen Startpunkt.

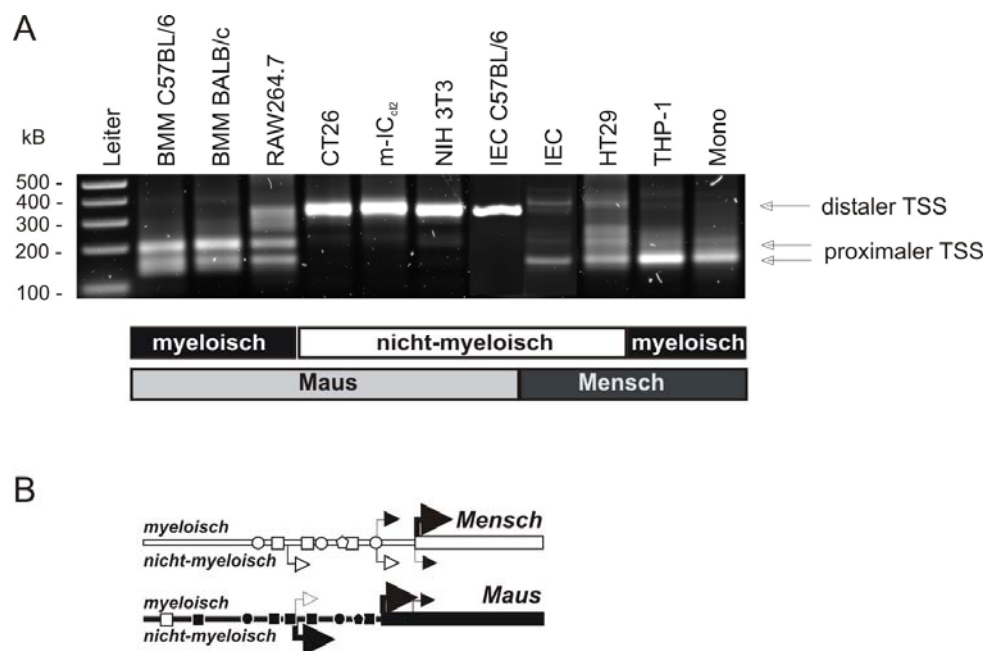


Abbildung 4-5. TSS-Analyse des *TLR4* Promotors bei Mensch und Maus

A. Myeloische und nicht-myeloische Zellen von Mensch und Maus wurden mittels einer 5'-RACE-PCR auf ihre *TLR4* TSSs untersucht. Die 5'-Enden der *TLR4* Transkripte wurden unter Verwendung eines Linker- und Gen-spezifischen Primers amplifiziert. Der distale und die beiden proximalen TSS sind mit Pfeilen gekennzeichnet. B. Schematische Darstellung des humanen und murinen *TLR4* Promotors (siehe auch Abbildung 4-4) zeigt die Position der nach Sequenzierung gefundenen TSSs. Dabei wurden oberhalb des jeweiligen Promotors die myeloischen und unterhalb die nicht-myeloischen TSSs gekennzeichnet. Verschiedene Pfeilgrößen geben die Häufigkeit der TSSs wieder und weiße Pfeile markieren kaum genutzte TSSs.

Durch die 5'-RACE-PCR Analysen wurden die *TLR4* Startpunkte (Mensch und Maus) neu definiert. Die bisher beschriebenen TSSs entsprechen selten genutzten TSSs (Abbildung 4-4). Die eigentlichen Haupttranskriptionsstarts liegen in Makrophagen ca. 80 bp stromabwärts des IRF/Ets-Motivs. Außerdem konnte zum ersten Mal ein alternativer, Zelltyp-spezifischer Promotor des *TLR4* Gens definiert werden, der ca. 200 bp stromaufwärts vom Makrophagen TSS liegt. Dieser

sogenannte distale Promotor wird in nicht-myeloischen Zellen der Maus ausschließlich benutzt. Dagegen ist in den entsprechenden humanen Zellen die Transkription von beiden Promotoren möglich, wobei der proximale Promotor bevorzugt wird.

4.2.2 Sequenzvergleich der minimalen *TLR4* Promotoren

Die Sequenz des *TLR4* Promotors sollte neben den bereits bekannten, zwischen Mensch und Maus konservierten und nicht-konservierten Elementen, auf weitere mögliche DNA-Motive untersucht werden. Dazu wurde ein Sequenzalignment des *TLR4* Promotors von mehreren Spezies, darunter Mensch, Schimpanse, Rind, Hund, Ratte und Maus erstellt (Abbildung 4-6). Generell lässt sich der *TLR4* Promoter wie viele Haushaltsgene in die Gruppe der TATA-losen Promotoren einordnen. Innerhalb der 650 bp Region wurden etliche, für myeloische Promotoren typische Ets-Motive gefunden. Diese Bindestelle mit der Konsensussequenz 5'-GGAA-3' wird von Transkriptionsfaktoren aus der Ets-Familie erkannt, wobei das bekannteste und für Makrophagen wichtigste Mitglied dieser Familie der myeloische und B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor PU.1 ist. In der humanen Sequenz wurden insgesamt vier mögliche PU.1-bindende Elemente (PU.1_0, 1, 2 und 3) bzw. acht im murinen Promotor (PU.1_1-8) gefunden, wobei PU.1_1, PU.1_2 und PU.1_5 zwischen allen Spezies konserviert ist. Weitere hochkonservierte Elemente sind eine kombinierte IRF/Ets-Bindestelle (IRF/PU.1_1) und eine putative AP1-Bindestelle, die mit einer E-Box mit der Konsensussequenz 5'-CANNTG-3' überlappt (E-Box/AP1).

Schließlich wurden im 3'-Bereich der analysierten humanen Sequenz weitere Motive identifiziert, die im murinen Promotor nicht vorhanden sind. Neben dem PU.1_0 Ets-Motiv befinden sich in dieser Region noch eine GC-Box und eine NF-Y (Nuclear Factor Y)-Bindestelle (CCAAT-Box), die jeweils nur zwischen Mensch und Schimpanse konserviert sind. Nicht zuletzt konnte nach der TSS-Bestimmung im humanen Promotor ein Pyrimidin-reiches Initiator-like Motiv (INR) mit der Konsensussequenz $\text{C}_T \text{C}_T \text{A}(+1) \text{N} \text{T}_A \text{C}_T \text{C}_T$ identifiziert werden (Schumacher, M. A. et al. 2003).

Anhand dieses Vergleichs der *TLR4* Promotoren waren eine Reihe von potentiell signifikanten Unterschieden erkennbar, die für unterschiedliche Regulationsmechanismen in Mensch und Maus verantwortlich sein könnten.

Potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind mit blauen (konservierte PU.1 und ICSBP Motive) oder grauen Boxen hinterlegt und die Beschriftung für die humane Sequenz befindet sich über und die der murinen Sequenz unter den Zeilen. Das StartATG ist mit einer schwarzen Box hinterlegt und *out-of-frame* ATGs sind in Rot gedruckt. TSSs einzelner Klone der 5'-RLM-RACE-PCR sind mit farbigen Kästchen über (human) oder unter (murin) der Sequenz gekennzeichnet (human: **Monozyten**, **Makrophagen**, myeloische **THP1** Zellen, **IEC**; murin: **BMM** C57B/6, **RAW264.7** Makrophagen, **NIH3T3** Fibroblasten, **CT26** Kolonkarzinom). Konservierte Nukleotide sind fettgedruckt und die in Makrophagen definierte TSSs sind in Violett **(+1)**.

4.2.3 Identifizierung wichtiger *cis*-Elemente des *TLR4* Promotors im Reportersystem

Reportergenassays sind relativ einfache und robuste Analyseverfahren, mit deren Hilfe die Aktivität von Promotoren untersucht werden kann. Im Allgemeinen wird ein Promotorfragment in einen Vektor (hier pGL3 oder pGL4) vor das Reportergen (hier Luziferase) kloniert und in geeignete Zelllinien transfiziert. Über die Aktivität des Reportergens (Luziferaseaktivität) können Aussagen über die Promotoraktivität gemacht werden. Durch gerichtete Mutagenese können außerdem putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen mutiert werden und bei veränderter Reporteraktivität über ihre Wirkung auf den Promotor geschlossen werden.

Um den *TLR4* Promotor weiter zu charakterisieren, wurden Luziferase-Reporterkonstrukte des minimalen humanen *TLR4* Promotors (hWt: -501 - +112) und minimalen murinen *Tlr4* Promotors (mWt: -428 - +112) verwendet (Hähnel, Viola 2003, Rehli, M. et al. 2000). Ausgehend davon wurden weitere Konstrukte mit Mutationen putativer DNA-Bindestellen hergestellt.

Die nach transienter Transfektion in RAW264.7 Makrophagen gemessene Luziferaseaktivität der einzelnen Konstrukte ist in Abbildung 4-7 zusammengestellt. Auffällig war die wesentlich schwächere Aktivität des murinen Wildtyp-Konstruktes (dreifach höher als der leere pGL3-Basic Vektor) gegenüber dem humanen Wildtyp-Konstrukt (18-fach höher als der leere pGL3-Basic Vektor). Durch Mutation der im Alignment gefundenen putativen Bindestellen (Abbildung 4-6) konnten in der humanen Promotorsequenz mehrere, für die Transkription wichtige DNA-Motive identifiziert werden (Abbildung 4-7.A). Von den vier PU.1-Motiven führten zwei (PU.1_1 und PU.1_2) zum fast vollständigen Verlust der Reporteraktivität und ein ähnlich starker Rückgang wurde nach Mutation der IRF-Bindestelle (mIRF) gemessen. Die NF-Y Box und die konservierte AP1/E-Box (mA/E) waren ebenfalls für die Reporteraktivität in Makrophagen notwendig. Eine Mutation der nur in der humanen Sequenz vorkommenden GC-Box hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Reporteraktivität. Interessanterweise ging bei dem transfizierten Konstrukt mit der mutierten Initiator-like Sequenz (mINR) die Expression im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (hWt) um fast die Hälfte zurück, wobei die Integration einer weiteren PU.1-Bindestelle an dieser Stelle die Expression sogar verdoppelte.

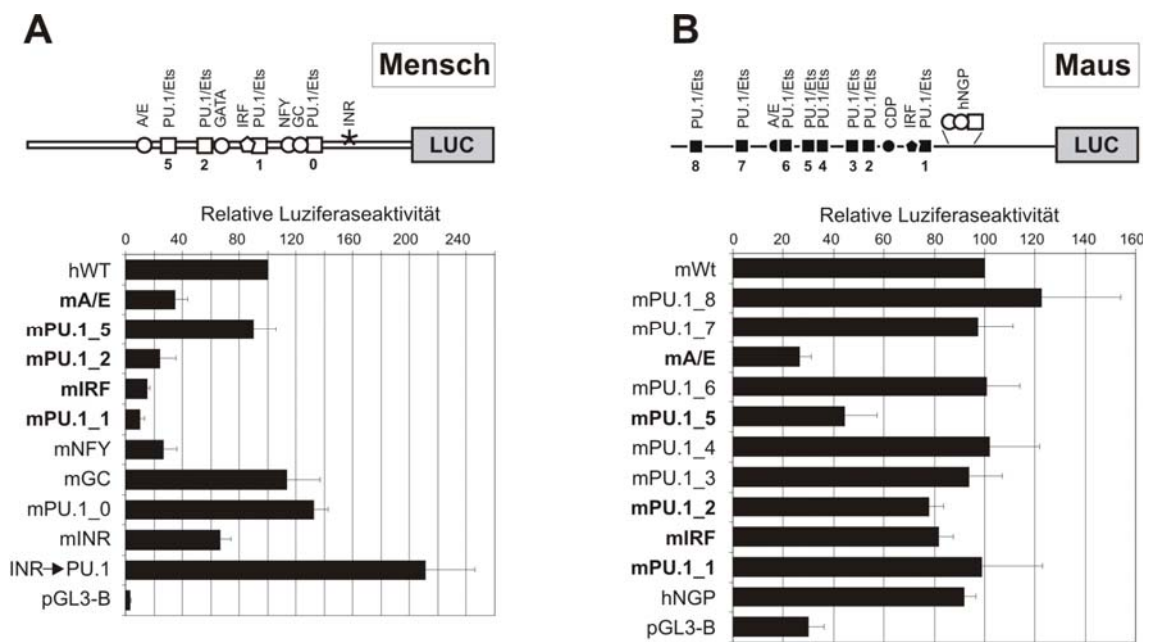


Abbildung 4-7. Reporteranalysen des murinen und humanen *TLR4* Promotors in RAW264.7

pGL3-Luziferase Konstrukte der humanen (A) und murinen (B) Wildtyp (Wt)-*TLR4* Promotoren sowie Konstrukte mit Mutationen möglicher Bindestellen wurden in RAW264.7 Makrophagen transient transfiziert. Die Luciferasewerte (+ SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und mit Renilla-Luziferasewerten normalisiert) sind relativ zum jeweiligen Wildtyp-Konstrukt (mWT oder hWT) und im Vergleich zum leeren Basic-Vektor (pGL3-B) angegeben. Zwischen den beiden Spezies konservierte Bindemotive sind fettgedruckt und über dem Diagramm ist der jeweilige Promotor mit den Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die mutiert wurden, schematisch dargestellt. Abkürzungen: A/E: AP1/E-Box, GATA: GATA-Bindestelle, NFY: CCAAT-Box, GC: GC-Box, INR: Initiator-like Sequenz, CDP: CCAAT Displacement Protein, hNGP: human NFY+GC+PU.1/Ets)

Im Mauspromotor (Abbildung 4-7.B) konnten dagegen nur wenige DNA-Motive für die Reporteraktivität verantwortlich gemacht werden. Von den acht PU.1-Motiven leistete nur PU.1_5 einen signifikanten Beitrag zur Expression und die Mutation der AP1/E-Box führte zu einem Rückgang der Reporteraktivität um mehr als zwei Drittel. Beides wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt (Roger, T. et al. 2005). Die beschriebene Notwendigkeit des PU.1_8-Motivs für eine maximale Aktivität konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zum humanen Promotor ist der Einfluss der IRF-Bindestelle auf die Reporteraktivität des Mauspromotors vernachlässigbar und auch durch die Integration der in der Maus fehlenden NFY-Box, GC-Box und des weiteren PU.1-Motivs im 3'-Bereich (hNGP) konnte die Reporteraktivität nicht erhöht werden.

Zusammengefasst ist die A/E-Box von allen konservierten Elementen (A/E, PU.1_5, PU.1_2, IRF/PU.1_1) das einzige gemeinsame DNA-Motiv, das für die

TLR4 Transkription in beiden Spezies wichtig ist. Folglich lassen diese Analysen darauf schließen, dass unterschiedliche Promotorbereiche an der *TLR4* Regulation beteiligt sind.

4.2.4 Analyse der *TLR4* Sequenzunterschiede zwischen Mensch und Maus mittels chimären Reporterkonstrukten

Um die Promotorbereiche in Mensch und Maus einzugrenzen, die entweder zur Zunahme oder Abnahme der Reporteraktivität führen, wurden chimäre (human/murin) *TLR4* Promotor-Reporterkonstrukte konstruiert. Dabei wurden Abschnitte aus dem murinen Promotor sukzessive gegen die entsprechende humane Sequenz ausgetauscht.

In Abbildung 4-8.A sind die Ergebnisse von den transienten Transfektionen der Konstrukte, die ausgehend von der murinen *Tlr4* Sequenz einen zunehmenden Anteil der humanen Sequenz enthalten, dargestellt. Die gemessenen Reporteraktivitäten der entsprechenden Konstrukte des humanen Promotors, der durch immer größer werdende Sequenzabschnitte aus dem murinen Promotor substituiert wurde, sind in Abbildung 4-8.B zusammengestellt.

Die chimären Konstrukte in Abbildung 4-8.A (Ch5-7) und B. (Ch11-13) zeigten, dass der 3'-Bereich des murinen Promotors zu einem starken Verlust der Reporteraktivität führte. Dabei kommt ein Teil des Aktivitätsverlustes möglicherweise durch einen posttranskriptionellen Mechanismus zustande, da sich die ausgetauschten Sequenzen in den Konstrukten Ch6 und Ch7 hinter dem Transkriptionsstart befinden. Dagegen wirkte sich die murine 5'-Sequenz positiv auf die Luziferaseaktivität aus (Ch9/10). Besonders durch den fast vollständigen Verlust der Aktivität in dem Ch4 Konstrukt wurde klar, dass sich die für die Reporteraktivität verantwortlichen Elemente im murinen *Tlr4* Konstrukt in der Region stromaufwärts der IRF-Bindestelle befinden und nicht durch die humane Sequenz ersetzbar sind (Ch1-4). Im Gegensatz dazu ließ sich die aktivierende Eigenschaft des humanen Promotors auf die 3'-Region zurückführen (Ch5-7, Ch11-13).

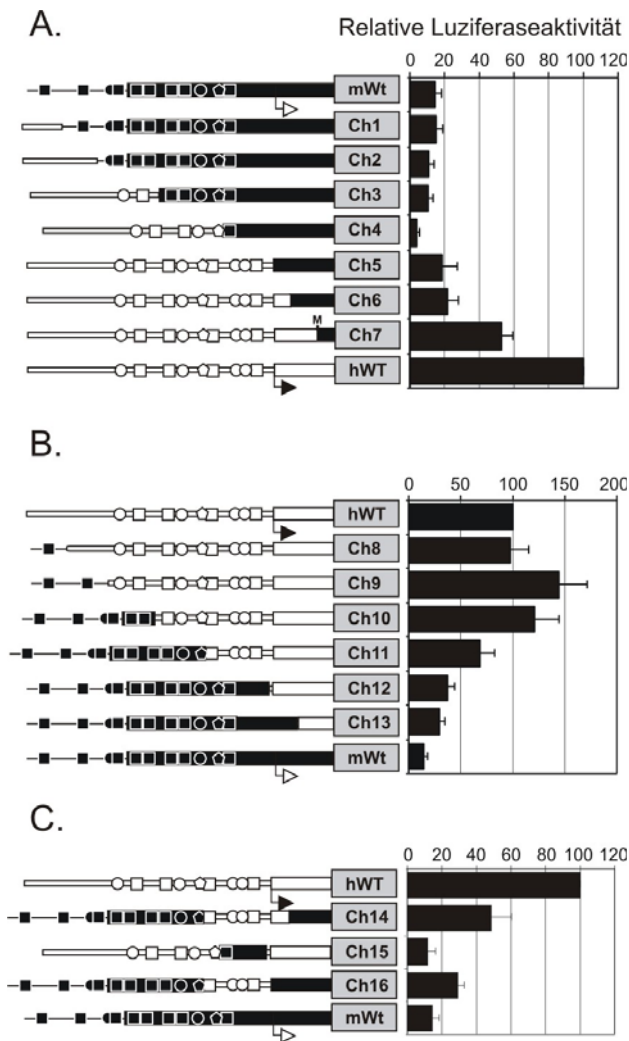


Abbildung 4-8. Reporteranalyse von chimären *TLR4* Konstrukten in RAW264.7 Makrophagen
 Chimäre Reporterkonstrukte (Ch1-16) wurden in RAW264.7 transient transfiziert. A. Ch1-7: Reihe von murinen Konstrukten mit zunehmendem humanem Anteil in der 5'-Region. B. Ch8-13: Reihe von humanen Konstrukten mit zunehmendem murinem Anteil in der 5'-Region. C. Die chimären Konstrukte Ch14-Ch16 zeigen speziell den Einfluss der nicht-konservierten humanen Region (NF-Y-Box, GC-Box und PU.1 Motiv) auf die Reporteraktivität. Sequenzabschnitte des murinen Promotors sind in schwarz und die des humanen Promotors in weiß schematisch dargestellt (vgl. Abbildung 4-7). Zur Orientierung markieren die Pfeile die in Monozyten und Makrophagen gefundenen TSSs, M in Ch7 zeigt die Position des StartATGs. Die Luziferasewerte + SD wurden mit Renilla-Luziferasewerten normalisiert und aus mindestens drei Experimenten berechnet.

Noch detaillierter konnte durch die Reporterkonstrukte in Abbildung 4-8.C gezeigt werden, dass die nicht-konservierten Elemente in der humanen 3'-Promotorregion (NF-Y, GC-Box, PU.1/Ets) zu einer Verdoppelung der Luziferaseaktivität führten. Offensichtlich ist die gesamte Region bis zum IRF/Ets-Motiv wichtig, da die alleinige Insertion im murinen Konstrukt hNGP (Abbildung 4-7.A) keinen Effekt auf die Expression hatte. Das humane Initiator-like Motiv scheint eine große Rolle für die Transkriptionsinitiation zu spielen und führte auch in den chimären Konstrukten zu einer deutlichen Erhöhung der Reporteraktivität (Ch16 → Ch14).

Die verschiedenen Konstrukte erlaubten eine grobe Zuordnung der aktiven Promotorbereiche beider Spezies. Im Einklang mit den in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Mutationsanalysen war die 5'-Region der murinen *Tlr4* Promotorsequenz bzw. die 3'-Region der humanen *TLR4* Promotorsequenz für die Reporteraktivität in Mausmakrophagen verantwortlich.

4.2.5 Bestimmung exogener TSSs der *TLR4* Reporterkonstrukte

Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse der Reporteranalysen mit murinen und humanen *TLR4* Promotoren (Abbildung 4-7) waren in Anbetracht der ähnlichen TSSs in beiden Spezies schwer erklärbar (Abbildung 4-5). Deshalb wurden zusätzlich die TSSs der Reporterkonstrukte mittels einer 5'-RLM-RACE-PCR bestimmt. Zur Amplifizierung der 5'-Enden wurden pGL3 Vektor- und Luziferase-spezifische Primer (5'PCR-luc as und pGL2) verwendet (Abbildung 4-9.A).

Nach der Transfektion von RAW264.7 Makrophagen wurden die RACE-Produkte des humanen (hWt) und murinen (mWt) Reporterkonstruktes in den pCR®2.1-TOPO Vektor kloniert und sequenziert.

Die Mehrzahl der hWt-Amplifikationsprodukte (~ 200 bp) konnten dem in humanen Makrophagen verwendeten proximalen TSS zugeordnet werden. Der Startpunkt des mWt-Reporterkonstruktes lag jedoch ungefähr 200 bp stromaufwärts (~ 400 bp) und entsprach dem endogenen distalen TSS in murinen nicht-myeloischen Zellen.

Weitere TSS-Analysen von transient transfizierten chimären Konstrukten zeigten eine stufenweise Verschiebung des distalen TSS (mWt) zum proximalen TSS (hWt) abhängig vom humanen Sequenzanteil im Reporterkonstrukt.

Mit diesem Ergebnis konnten die Unterschiede der vorher beschriebenen Reporteranalysen erklärt werden. Außerdem wurde klar, dass transiente Reporteranalysen für eine Analyse des murinen *Tlr4* Promotors in Mausmakrophagen nicht geeignet sind.

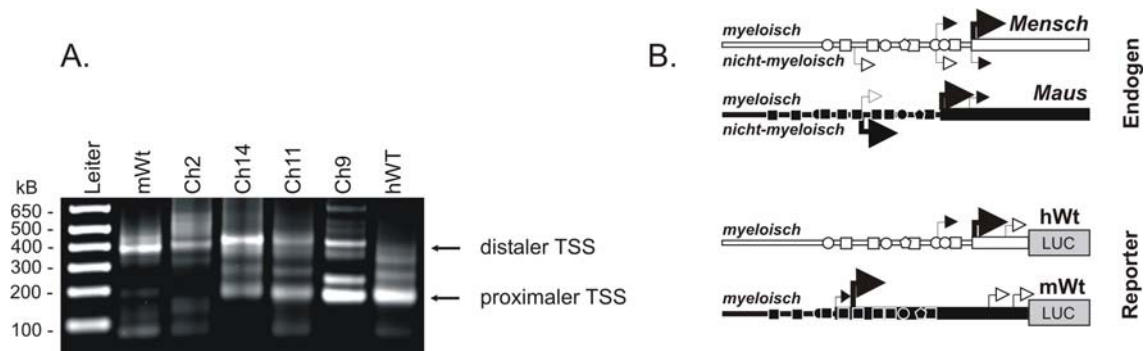


Abbildung 4-9. Exogene TSS-Analysen der *TLR4* Reporterkonstrukte mittels 5'-RACE-PCR

A. Humane und murine Reporterkonstrukte wurden transient in RAW264.7 Makrophagen transfiziert. Durch die Verwendung von pGL3 Vektor- und Luziferase-spezifischer Primer (5'PCR-luc as und pGL2) konnten die exogenen 5'-Enden der *TLR4*-Luziferase Transkripte bestimmt werden. B. Eine schematische Darstellung der Promotoren (siehe auch Abbildung 4-7) zeigt die durch 5'RACE-PCR bestimmten TSSs in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen (Endogen) im Vergleich zu den exogenen TSSs des hWt und mWt Konstruktes in myeloischen Zellen (Reporter).

In Abbildung 4-9.B sind die exogenen und endogenen TSS-Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zusammengefasst. Da in Mausmakrophagen aus unbekannten Gründen der distale TSS des murinen Reporterkonstruktes benutzt wird, wurde in den Reporterstudien nicht der myeloische Promotor sondern der nicht-myeloische Promotor untersucht.

Im Gegensatz dazu wurden im humanen Reporterkonstrukt die authentischen Makrophagen-spezifischen TSSs detektiert. Folglich sind die unterschiedlichen Ergebnisse der murinen und humanen Reporteranalysen größtenteils auf die verschiedenen Promotoren zurückzuführen.

4.2.6 Protein-DNA Interaktion am *TLR4* Promoter *in vivo*

Nachdem sich die Reporteranalysen als nicht geeignet für den Vergleich der *TLR4* Expression in murinen und humanen Makrophagen herausstellten, wurde nach einem anderen Zugang gesucht um die *TLR4* Regulation beider Spezies sowohl in Makrophagen als auch nicht-myeloischen Zellen zu studieren.

Die Wahl fiel auf die DMS (Dimethylsulfat) *in vivo* Footprint Methode (Kapitel 3.2.8), bei der Protein-DNA Interaktionen *in vivo* nachgewiesen werden können. Dazu werden Proteine und DNA kovalent vernetzt und anschließend eine spezifische DNA-Methylierung (Guanine/Adenine) durch DMS durchgeführt. Eine chemische Spaltung aller methylierten Nukleotide durch Piperidin führt zur Fragmentierung der DNA. Nach einer LM-PCR (Ligation-mediated PCR) werden

die DNA-Bruchstücke mittels Sequenz-spezifischer Primer vermehrt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Fluoreszenz-markierte Primer können die Sequenzabschnitte der analysierten Promotorregion visualisiert werden (Kapitel 3.2.8.2) und Bindestellen, die durch die Besetzung von Proteinen vor der DMS-Methylierung geschützt waren, identifiziert werden.

In den folgenden Footprints des *TLR4* Promotors sind geschützte DNA-Bereiche und unmittelbar angrenzende Nukleotide durch eine Hypomethylierung (→ Verlust des DNA-Fragmentes) und/oder Hypermethylierung (→ Anreicherung des DNA-Fragmentes) gekennzeichnet.

4.2.6.1 Vergleich myeloischer Zellen von Mensch und Maus

Zunächst wurden *in vivo* Footprints des bereits in Makrophagen *in vitro* (Reporterassays, EMSA) charakterisierten, humanen *TLR4* Promotors durchgeführt (Rehli, M. et al. 2000). Die Promotorstruktur in humanen Makrophagen wurde anschließend mit der Struktur des orthologen Promotors in murinen BMM verglichen um die in der Zelle (*in vivo*) besetzten DNA-Elemente identifizieren zu können.

Abbildung 4-10 zeigt die besetzten Transkriptionsfaktor-Bindestellen des *TLR4* Promotors in humanen Monozyten und Makrophagen, wobei alle Footprints in den Monozyten auch in den Makrophagen gefunden wurden. Von den putativen Ets-Bindestellen zeigten sich alle sensitiv für eine DMS-Methylierung, entweder direkt durch Hypomethylierungen (PU.1_1, PU.1_2) oder indirekt durch eine Hypermethylierung in den Randbereichen der Bindemotive (PU.1_0 und PU.1_5). Eine weitere Hypermethylierung zeigte sich angrenzend an die CCAAT-Box (NF-Y). Am deutlichsten waren die Footprints der kombinierten ICSBP/PU.1-Bindestelle und der AP1/E-Box.

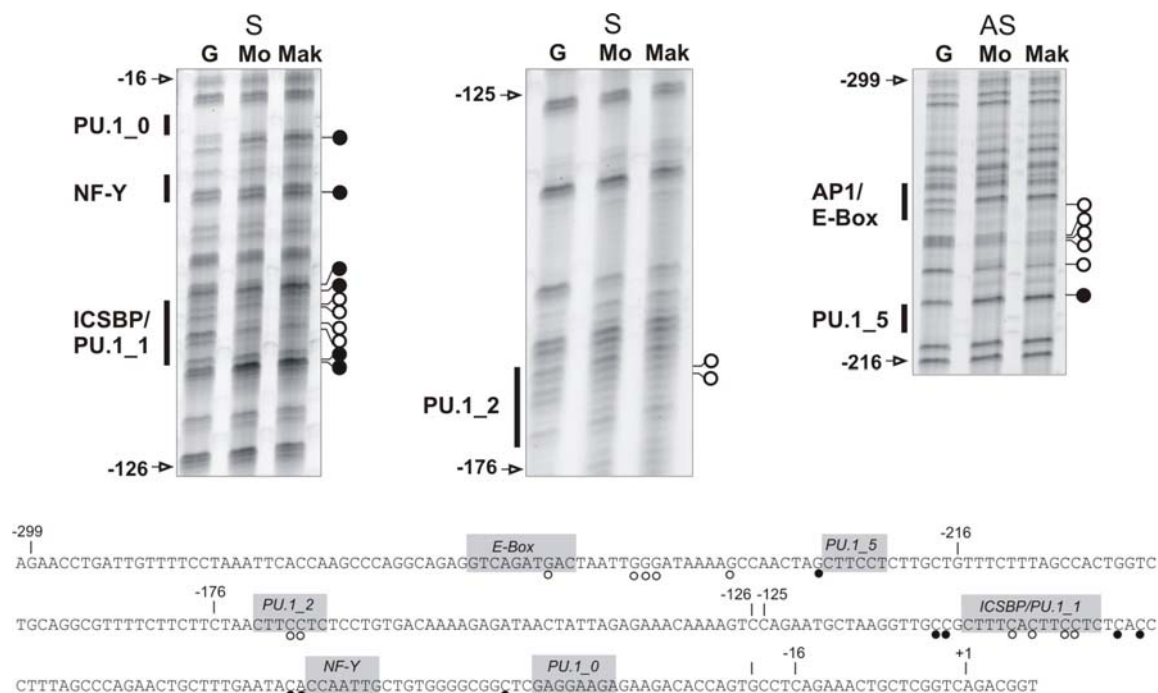


Abbildung 4-10. DMS *In vivo* Footprint des humanen *TLR4* Promotors in Monozyten und Makrophagen

Die DMS/Piperidin-behandelte DNA von Monozyten (Mo) und Makrophagen (Mak) wurde nach LM-PCR im Vergleich zur nackten DNA (G) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Sequenzabschnitte des *TLR4* Promotors sind nach dem Startpunkt in Makrophagen (+ 1) nummeriert und je nach verwendetem Primer in sense- (S) oder antisense- (AS) Strangrichtung sind dementsprechend Cytosine oder Guanine sichtbar. Mögliche DNA-Bindestellen sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet und Hyper- oder Hypomethylierungen sind durch gefüllte bzw. leere Kreise sowohl in der Abbildung als auch in der analysierten Sequenz des *TLR4* Promotors hervorgehoben.

Ein ähnliches Footprinting Profil konnte auch in der humanen, monozytären THP1 Zelllinie nachgewiesen werden (Abbildung 4-11). Wegen dem zu frühen Abbruch der sense-Sequenzierreaktion blieb allerdings die Besetzung der PU.1_2-Bindestelle unklar.

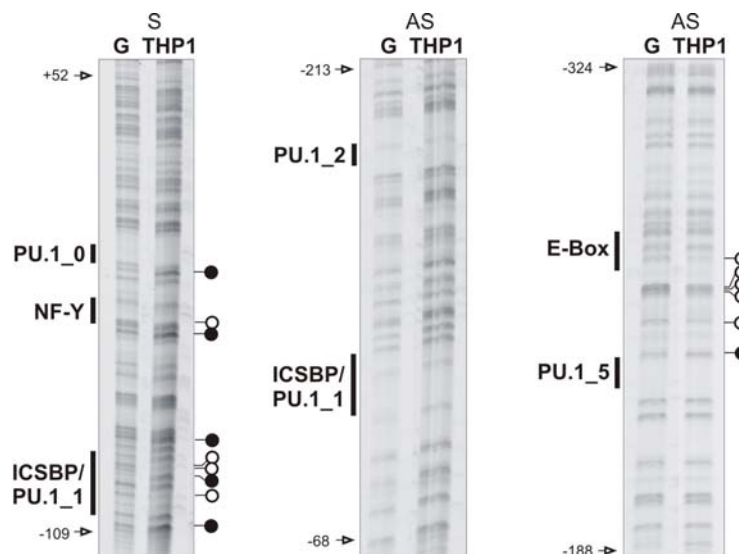


Abbildung 4-11. DMS *in vivo* Footprint des *TLR4* Promotors in der monozytären Zelllinie THP1

DNA von THP1 Zellen wurde mit DMS/Piperidin behandelt und über LM-PCR amplifiziert. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Footprints im *TLR4* Promotor im Vergleich zur nackten DNA (G) sichtbar. Hyper- oder Hypomethylierungen die in sense- (S) oder antisense- (AS) Richtung gesehen werden können, sind durch gefüllte bzw. leere Kreise gekennzeichnet. Die Sequenzabschnitte sind wiederum nach dem Startpunkt in Makrophagen (+1) nummeriert, und mögliche DNA-Bindestellen mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet (Sequenz siehe Abbildung 4-10).

Die *in vivo* besetzten Bindestellen in primären Monozyten, Makrophagen und THP1 Zellen stimmen mit den DNA-Elementen überein, die bei den in Makrophagen durchgeführten Reporterassays für eine maximale Reporteraktivität verantwortlich waren. Somit bestätigen die *in vivo* Footprints des humanen *TLR4* Promotors die *in vitro* durchgeführten Mutationsanalysen (Abbildung 4-7).

Der murine *Tlr4* Promotor wurde in BMM mittels DMS *in vivo* Footprinting untersucht. (Abbildung 4-12). Im Vergleich mit dem humanen myeloischen Promotor (Abbildung 4-10, Abbildung 4-11) wurden in den myeloischen Zellen der Maus ähnliche Footprints gefunden. In beiden Spezies waren alle konservierten Regionen, darunter die kombinierte ICSBP/PU.1-Bindestelle, die AP1/E-Box und die PU.1_2-Bindestelle sensitiv gegenüber der DMS-Methylierung. Von den acht Ets-Bindestellen waren mit Ausnahme von PU.1_4 und PU.1_8 (nicht gezeigt) bei allen anderen putativen PU.1 Motiven Footprints detektierbar. Im murinen nicht-konservierten 3'-Bereich konnten im Gegensatz zum humanen Promotor, der in dieser Region eine NF-Y Box, GC-Box und ein PU.1-Motiv enthält, keine Footprints nachgewiesen werden.

Die *in vivo* Footprinting Analysen in Mausmakrophagen stehen im Widerspruch zu den Mutationsanalysen. Während für die Reporteraktivität nur die AP1/E-Box und die PU.1₅-Bindestelle wichtig waren (Abbildung 4-7), sind in den Makrophagen der Maus auch die für die Aktivität des humanen Promotors essentiellen PU.1-Bindestellen besetzt.

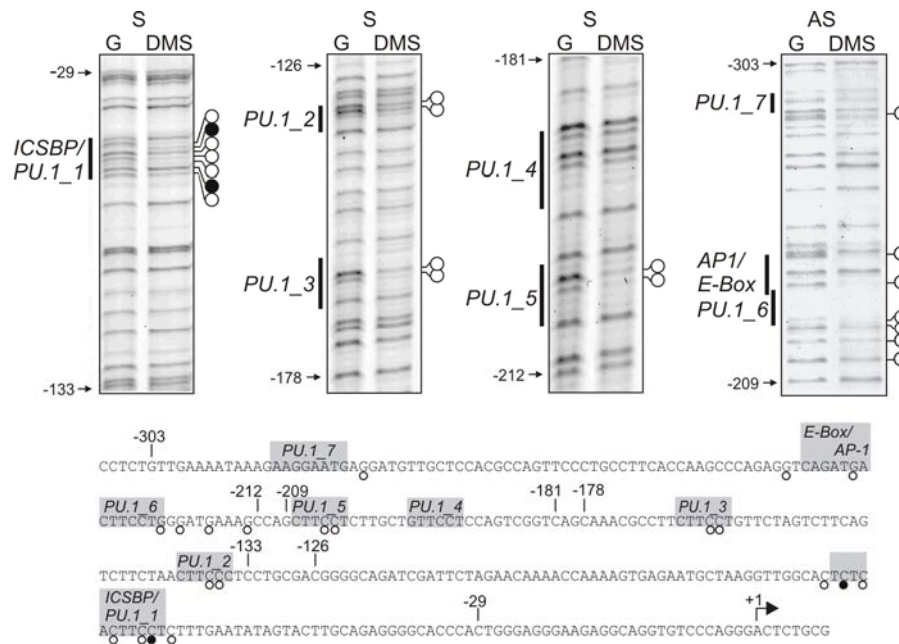


Abbildung 4-12. *In vivo* Footprint des murinen *Tlr4* Promotors in BMM

Aus C57B/6 Mäusen wurden BMM isoliert und die DNA mit DMS/Piperidin behandelt. Im Vergleich zur nackten DNA (G) waren wiederum ähnliche Hyper- und Hypomethylierungen (gefüllte/offene Kreise) wie beim humanen *TLR4* zu sehen. Die analysierten Bereiche sind nach dem Startpunkt des murinen Promotors in Makrophagen (+1) nummeriert und Sequenzierreaktionen wurden in sense- (S) oder antisense- (AS) Strangrichtung durchgeführt. Putative DNA-Bindestellen sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet und in der analysierten Sequenz des murinen *Tlr4* Promotors mit grauen Boxen hinterlegt.

4.2.6.2 Vergleich myeloischer und nicht-myeloischer Zellen der Maus

Die Verwendung alternativer *Tlr4* Promotoren bei myeloischen (proximaler TSS) und nicht-myeloischen (distaler TSS) Mauszellen veranlasste uns, weitere Untersuchungen zur Transkriptionsfaktor-Bindung *in vivo* in unterschiedlichen murinen Zelltypen durchzuführen. In Abbildung 4-13 ist ein vergleichender DMS Footprint von RAW264.7 Makrophagen, NIH3T3 Fibroblasten und CT26 Kolon-Epithelzellen dargestellt. Dabei war von den nicht-myeloischen Zellen, NIH3T3 und CT26, aus den TSS-Analysen (Abbildung 4-5) bekannt, dass in beiden Zelllinien ausschließlich der distale *Tlr4* Promotor benutzt wird.

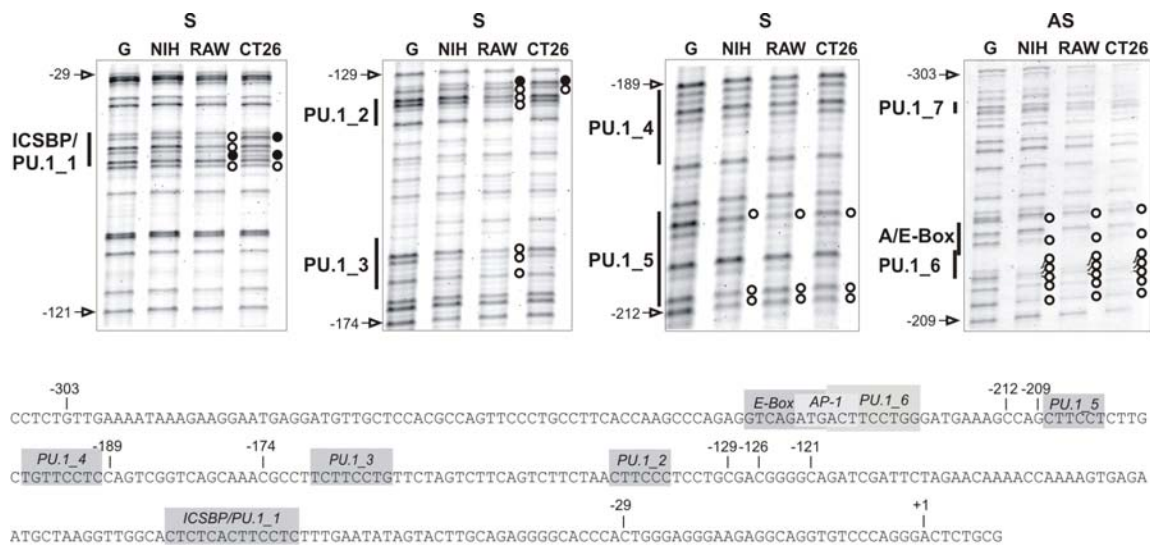


Abbildung 4-13. DMS *In vivo* Footprint des *Tlr4* Promotors in unterschiedlichen Zelltypen

Die DNA der myeloischen Zelllinie RAW264.7 und den nicht-myeloischen Zelllinien NIH3T3 und CT26 wurde auf ihre Sensitivität gegenüber DMS-Methylierung untersucht. Hyper- oder Hypomethylierungen (gefüllte/leere Kreise) im Vergleich zur nackten DNA (G) sind in jeder einzelnen Spur vermerkt. Die Sequenzabschnitte sind nach dem TSS in BMM (+ 1) nummeriert und die Sequenzierreaktionen wurden entweder in sense- (S) oder antisense- (AS) Strangrichtung durchgeführt. Putative DNA-Bindestellen sind in der Abbildung mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet und in der Sequenz mit grauen Boxen hinterlegt.

Wie erwartet, waren sehr deutliche Unterschiede in der Besetzung der DNA-Bindestellen zwischen den verschiedenen Zelltypen sichtbar. Während bei RAW264.7 Makrophagen die Footprints in den gleichen Regionen wie schon bei den BMM nachgewiesen wurden, unterschieden sich die nicht-myeloischen Zellen besonders im 3'-Bereich des *Tlr4* Promotors. Dabei zeigten die Fibroblastenzellen NIH3T3 vom TSS bis zur PU.1_4-Bindestelle überhaupt keine Protein-DNA-Interaktionen. Zwar waren bei den Kolonepithelzellen CT26 geringe Unterschiede in der DMS-Methylierung von ICSBP/PU.1 und PU.1_2 vorhanden, insgesamt waren die CT26 Zellen aber den NIH3T3 ähnlicher als den RAW264.7. Die Besetzung von mehreren Ets-Motiven in den PU.1-negativen NIH3T3 (PU.1_5 und 6) und CT26 (PU.1_1, 2, 5 und 6) deutete auf eine Beteiligung anderer Faktoren aus der Ets-Familie an der *Tlr4* Regulation in diesen Zellen hin.

4.2.7 Analyse des proximalen *Tlr4* Promotors

Die Existenz von zwei Promotoren im *Tlr4* Gen, die in der Maus sehr strikt Zelltyp-spezifisch benutzt werden, war neu. In weiteren Untersuchungen wurde deshalb der proximale Promotor und der alternative, distale Promotor der Maus

näher charakterisiert. Zunächst sollten Transkriptionsfaktoren, die an der Expression des Makrophagen-spezifischen proximalen Promotors beteiligt sind, identifiziert werden. Die Besetzung der vielen Ets-Motive und der IRF-Bindestelle in den Footprints deutete auf die Bindung von sowohl Ets-Faktoren als auch Transkriptionsfaktoren aus der IRF-Familie hin.

4.2.7.1 Einfluss des Makrophagen-spezifischen Transkriptionsfaktors PU.1

Ets-Transkriptionsfaktoren gehören zu den Helix-Loop-Helix (HLH)-Proteinen und zeichnen sich besonders durch ihre Ets-DNA-Bindedomäne aus. Neben Protein-DNA-Interaktionen sind Ets-Faktoren nicht selten auch durch Protein-Protein-Interaktionen an der Regulation spezifischer Promotoren beteiligt (Sharrocks, A. D. et al. 1997). Am naheliegendsten für eine Bindung an die im *Tlr4* Promotor vorhandenen Ets-Bindestellen (5'-GGAA-3') war PU.1, ein sehr wichtiger Transkriptionsfaktor in Makrophagen (Ross, I. L. et al. 1998, Scott, E. W. et al. 1994).

Mit einem EMSA (Electromobility Shift Assay) wurden alle acht Ets-Motive auf eine mögliche Bindung von PU.1 untersucht. In Abbildung 4-14.A sind die verwendeten Sonden mit dem konservierten Ets-Motiv 5'-GGAA-3' aufgelistet, die mit Kernextrakt aus BMM inkubiert wurden. Um eine spezifische Protein-DNA-Komplexbildung zu zeigen, wurde ein kalter Kompetitor in 20-fachem oder 100-fachem Überstand eingesetzt und Antiseren gegen die Transkriptionsfaktoren PU.1 und ICSBP verwendet (Abbildung 4-14.B).

PU.1-enthaltende Komplexe waren mit den radioaktiv markierten Sonden mPU.1_1, 2, 3 und 5 nachweisbar und weniger stark mit mPU.1_4 und 8. Da keine Bindung von PU.1 an mPU.1_6 und 7 detektiert wurde, ist aufgrund der Footprints in diesen Regionen die Beteiligung anderer Ets-Faktoren sehr wahrscheinlich. Hinweise auf eine Interaktion von PU.1 mit Icsbp an der kombinierten IRF/Ets-Bindestelle wurden durch eine geringfügige Komplexbildung von PU.1 und Icsbp mit der mPU.1_1 Sonde gegeben. Im Vergleich zur humanen Sequenz war die Bindung von Icsbp bei der Maus viel schwächer (Rehli, M. et al. 2000).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die *Tlr4* Regulation in Makrophagen sehr stark von dem Transkriptionsfaktor PU.1 abhängig zu sein scheint.

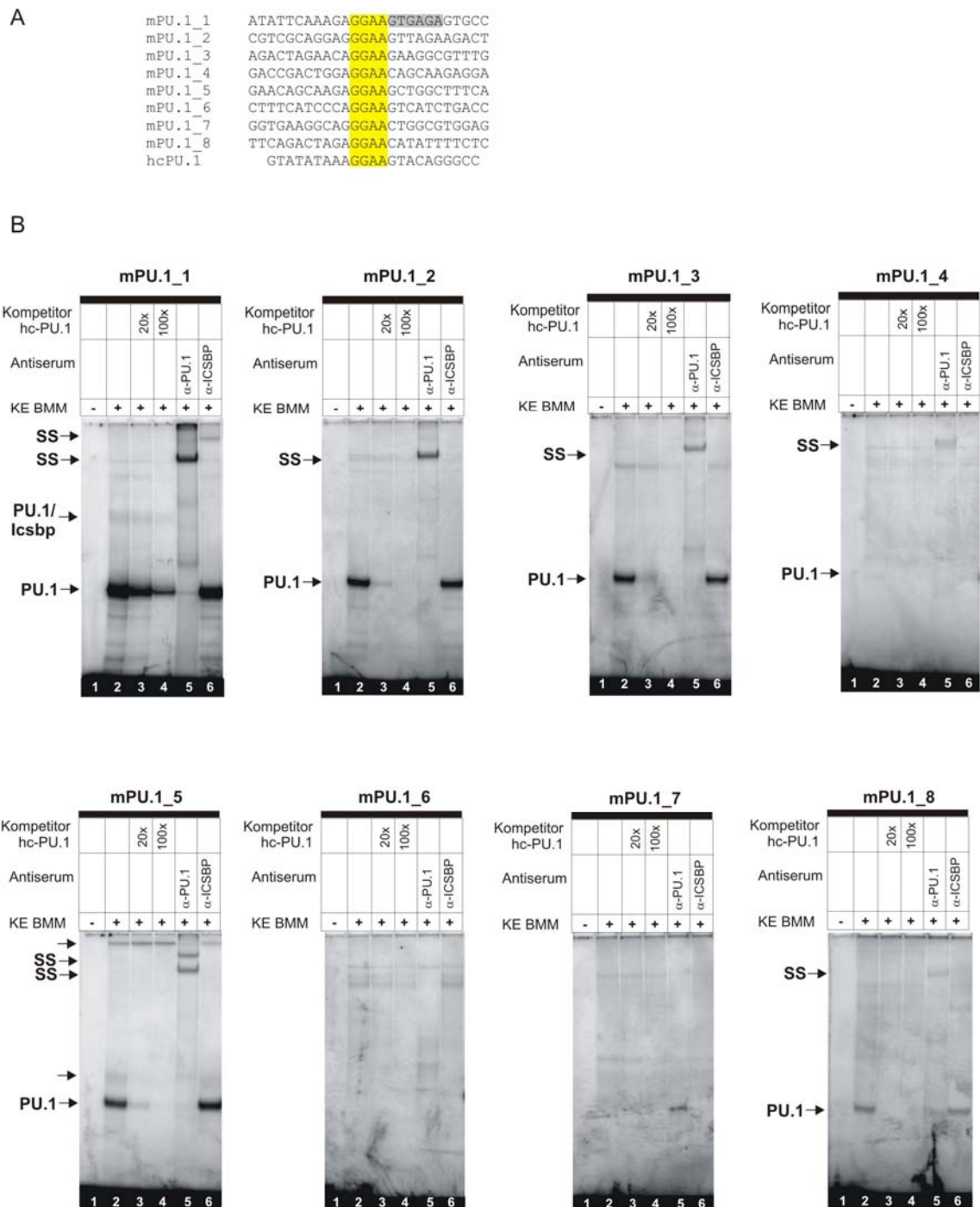


Abbildung 4-14. Bindung von PU.1 am *Tlr4* Promotor

A. Radioaktiv markierte Sonden (mPU.1_1-mPU.1_8) wurden für jede putative PU.1-Bindestelle des murinen *Tlr4* Promotors hergestellt. Die PU.1 Konsensussequenz 5'-GGAA-3' ist mit einer gelben und das IRF Motiv mit einer grauen Box hinterlegt. Das Oligonukleotid hcPU.1 wurde als kalter Kompetitor im 20x oder 100x Überschuß eingesetzt. B. Die Komplexbildung der einzelnen Sonden mit PU.1 (und Icsbp→mPU.1_1) ist gezeigt mit Kernextrakt (KE) aus BMM. Erzeugte Supershifts (SS) nach Inkubation mit Antiseren gegen PU.1 und ICSBP sind ebenfalls gekennzeichnet. Unbeschriftete Pfeile weisen auf Komplexe mit unbekannten Proteinen hin.

4.2.7.2 ICSBP als ein Regulator der TLR Expression

Zu den konservierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *TLR4* Promotor gehört auch eine kombinierte IRF/Ets-Bindestelle (IRF/PU.1_1), die für eine Beteiligung von IRF-Faktoren an der Regulation verantwortlich sein könnte. Die Familie der IRF besteht aus insgesamt neun Mitgliedern (IRF1 bis IRF9), von denen viele entscheidend in der TLR Signalkaskade involviert sind (Honda, K. and Taniguchi, T. 2006). Vom humanen *TLR4* Promotor ist bereits bekannt, dass ICSBP in myeloischen Zellen an das IRF/Ets-Element bindet, welches unentbehrlich für die maximale Aktivität des humanen Reporterkonstruktes ist ((Rehli, M. et al. 2000) und Abbildung 4-7). Bei den vorherigen EMSA-Analysen wurde bereits eine schwache Bindung von Icsbp an den murinen *Tlr4* Promotor gezeigt, die Reporteranalysen des murinen Konstruktes (siehe Kapitel 4.2.5) hatten sich jedoch als ungeeignet für Analysen des proximalen Promotors herausgestellt. Um die Abhängigkeit der murinen *Tlr4* Expression von dem Transkriptionsfaktor Icsbp zu klären, sollte die *Tlr4* Expression in BMM aus Wildtyp (Wt) und Icsbp „Knock-out“ (K.o.) Mäusen und in Abhängigkeit von externen Stimuli untersucht werden (Kooperation mit Prof. Ivan Horak, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin). Dazu wurden isolierte BMM in Kultur genommen und zu zwei Zeitpunkten (4 h und 24 h) entweder unbehandelt belassen, oder mit den Interferonen IFN β (Klasse I) und IFN γ (Klasse II) sowie LPS stimuliert.

In Abbildung 4-15 sind die Ergebnisse der *Tlr4* mRNA Analysen dargestellt.

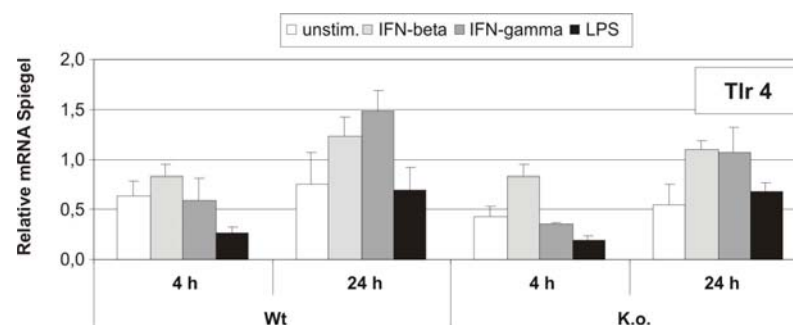


Abbildung 4-15. Quantitative Real-time *Tlr4* Expression in Icsbp K.o. Mäusen

BMM von Wildtyp (Wt) und Icsbp K.o. (K.o.) Mäusen wurden mit IFN-beta (100 U/ml), IFN-gamma (100 U/ml) und LPS (100 ng/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten die RNA präpariert. Die *Tlr4* Spiegel wurden mit einer Real-time-PCR bestimmt und das Haushaltsgen *HPRT* diente zur Normalisierung. Quantitative PCR-Werte + SD stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Bis auf einen leichten Rückgang der konstitutiven Expression bei den *Icsbp*-defizienten Mäusen, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wt und K.o. Mäusen festzustellen. Die Stimulation mit den Typ I und Typ II Interferonen (IFN), IFN β und IFN γ , führte nach 24 Stunden zu einer Verdoppelung der *Tlr4* Expression. Dieser Effekt ist unabhängig von *Icsbp*, nachdem auch in den K.o. Mäusen eine Induzierbarkeit der Expression durch IFN vorhanden war. Nach Stimulation der BMM mit LPS wurde die mRNA sowohl in Wt als auch K.o. Mäusen nur temporär herunterreguliert (4 h), nach 24 Stunden konnten wieder normale *Tlr4* Spiegel gemessen werden.

Zum Vergleich wurde unter den gleichen Bedingungen die Expression von *Tlr3* untersucht. Dessen Promotor weist zwei IRF-Motive auf und wird besonders stark durch IFN β induziert (Heinz, S. et al. 2003) (Abbildung 4-16).

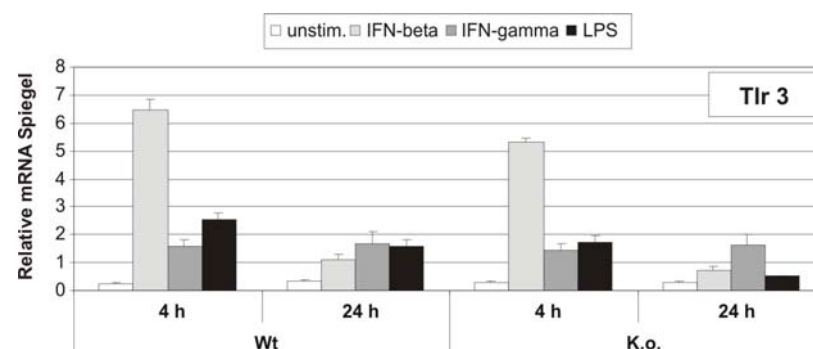


Abbildung 4-16. Real-time quantitative *Tlr3* Expression in *Icsbp* K.o. Mäusen

Nach dem gleichen Protokoll wie in Abbildung 4-15 beschrieben, wurden die BMM von Wt und *Icsbp* K.o. Mäusen auf ihre Interferon-regulierte *Tlr3* Expression untersucht. Die *HPRT*-normalisierten Real-time PCR Werte + SD wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

Im Gegensatz zu *Tlr4* wurde *Tlr3* viel stärker über Interferone reguliert, besonders über IFN β , jedoch scheint die Signalkaskade unabhängig von *Icsbp* zu sein. Bereits vier Stunden nach Stimulation mit IFN β wurde eine 25-fache Expression gemessen, die sich aber bereits nach 24 Stunden dem Spiegel der Expression nach IFN γ - und LPS-Stimulation annäherte (4-fach). Die mit LPS stimulierten BMM der Wt und K.o. Mäuse zeigten ebenfalls schon nach vier Stunden eine Hochregulation der *Tlr3* mRNA. Der einzige Unterschied zwischen den Wt und

K.o. Mäusen war der schnellere Rückgang auf den Ausgangs-mRNA Spiegel bei den Icsbp-defizienten Mäusen nach LPS-Stimulation.

Diese Ergebnisse zeigten, dass der IRF-Faktor Icsbp in der Maus nur minimal an der konstitutiven Expression von *Tlr4* und *Tlr3* beteiligt ist, aber in der Regulation nach einer Stimulierung keine Rolle spielt.

4.2.8 Analyse des alternativen, distalen Promotors und Funktion der AP1/E-Box

Die Entdeckung des Zelltyp-spezifischen alternativen *Tlr4* Promotors in Epithelzellen und Fibroblasten der Maus veranlasste eine detailliertere Charakterisierung der hochkonservierten AP1/E-Box. Diese setzt sich aus der von einer anderen Arbeitsgruppe bereits beschriebenen AP1-Bindestelle (Roger, T. et al. 2005) und einer E-Box mit der Konsensussequenz 5'-CANNTG-3' zusammen.

4.2.8.1 Mutationsanalysen

Zunächst wurden Reporteranalysen zum distalen Promotor durchgeführt. Dazu wurde der *Tlr4* Promotor im murinen Wildtyp-Konstrukt (mWt: -428 - +112) und den mutierten Konstrukten soweit verkürzt, dass alle distalen TSSs, die in nicht-myeloischen Zellen der Maus detektiert wurden, gerade noch enthalten waren (dmWt: -428 - -141). Dadurch sollten andere regulatorische Elemente des proximalen, myeloischen Promotors ausgeschlossen werden und die Ergebnisse ausschließlich den distalen, nicht-myeloischen Promotor charakterisieren. Alle auf diese Weise erhaltenen Reporterkonstrukte wurden sowohl in RAW264.7 Makrophagen als auch NIH3T3 Fibroblasten transfiziert. In

Abbildung 4-17 ist zunächst die Reporteraktivität des dmWt-Konstruktes in den beiden Zelllinien zu sehen. Die *Tlr4* Expression des distalen Promotors war in der myeloischen Zelllinie gegenüber den nicht-myeloischen Zellen 2,5-fach erhöht und lässt das Vorhandensein aktivierender Transkriptionsfaktoren vermuten, die nur in myeloischen Zellen aktiv sind.

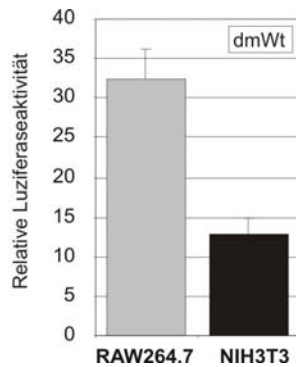


Abbildung 4-17. Luciferase-Aktivität des alternativen *Tlr4* Promotors in RAW264.7 und NIH3T3

Das Reporterkonstrukt des distalen Promotors dmWt wurde in RAW264.7 und NIH3T3 transient transfiziert. Die Luciferasewerte + SD sind mit den Renilla-Luciferasewerten normalisiert und wurden aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Der Einfluss der einzelnen, putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf die Expression des distalen Promotors war in den beiden Zelllinien ähnlich (Abbildung 4-18) und auch mit den Transfektionen der originalen mWt-Konstrukte vergleichbar (Kapitel 4.2.3).

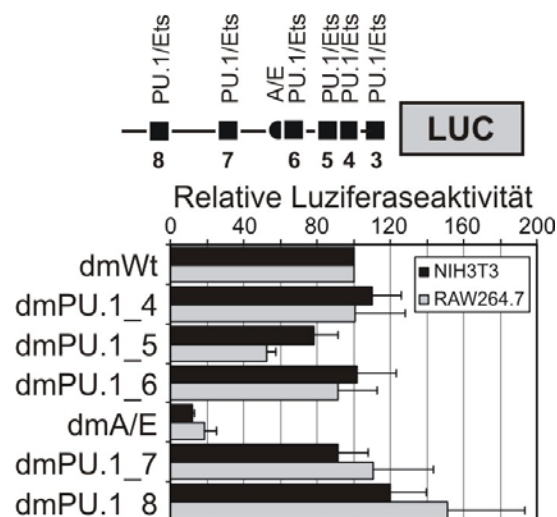


Abbildung 4-18. Luciferase-Assay des alternativen, distalen Promotors

RAW264.7 und NIH3T3 Zellen wurden mit pGL3-Reporterkonstrukten des distalen Wildtyp *Tlr4* Promotors (dmWt) und den gleichnamig mit der mutierten Bindestelle bezeichneten Konstrukten transient transfiziert. Der schematisch dargestellte *Tlr4* Promotor verdeutlicht die im Konstrukt vorhandenen Bindestellen, die jeweils einzeln mutiert wurden. Die Ergebnisse aus der Transfektion in jeder Zelllinie wurden jeweils relativ zum dmWt-Konstrukt (100%) angegeben. Die Luciferasewerte + SD wurden mit Renilla-Luciferasewerten normalisiert und aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Von den fünf Ets-Elementen wirkte sich nur die Mutation des PU.1_5-Motivs signifikant auf die Reporteraktivität aus. Da NIH3T3 Fibroblasten kein PU.1 exprimieren, gibt dieses Experiment wiederum einen deutlichen Hinweis auf die Bindung eines anderen Ets-Faktors in diesen Zellen. Die AP1/E-Box ist das wichtigste Element im distalen Promotor und die Mutation führte in beiden

Zelllinien zu einem starken Verlust der Reporteraktivität (dmA/E). Dass die AP1/E-Box nicht nur an der Regulation in nicht-myeloischen Zellen eine Rolle spielt, zeigten die Footprints der humanen und murinen Makrophagen (Abbildung 4-10, Abbildung 4-12) sowie die Ergebnisse der Reporteranalysen des humanen *TLR4* Konstruktes (Abbildung 4-7).

4.2.8.2 Identifikation von Transkriptionsfaktoren *in vitro*

EMSAs stellen eine Möglichkeit dar, die Bindung von Kernproteinen an definierte Sequenzabschnitte *in vitro* nachzuweisen und durch die Verwendung von Antisera Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Auf der Suche nach möglichen Transkriptionsfaktoren, die an das konservierte AP1/E-Box-Element binden und die *Tlr4* Expression antreiben, war der Transkriptionsfaktor AP1 (Activator Protein), der die Konsensussequenz 5'-TGAC-3' erkennt, am naheliegendsten. Außerdem hatte eine andere Arbeitsgruppe bereits die Bindung von AP1 an den murinen *Tlr4* Promotor postuliert (Tsatsanis, C. et al. 2006). Das E-Box (5'-CANNTG-3')-Motiv ist bei Zelltyp- oder entwicklungsspezifischen Genen weit verbreitet. Transkriptionsfaktoren, die eine bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-Struktur aufweisen oder bHLH-ZIP Proteine können als Homo- oder Heterodimere an die E-Box binden (Pabo, C. O. and Sauer, R. T. 1992). Dazu gehören Transkriptionsfaktoren aus der Mitf (Mikrophthalmia)-Familie, Mitf, TFE3, TFEB und TFEC (Beckmann, H. et al. 1990, Carr, C. S. and Sharp, P. A. 1990, Hershey, C. L. and Fisher, D. E. 2004), die USF (Upstream Stimulatory Factor)-Faktoren USF1 und USF2 (Gregor, P. D. et al. 1990) und der proliferationsspezifische Transkriptionsfaktor Myc mit seinen Dimerisierungspartnern Mad und Max (Ayer, D. E. et al. 1993).

Zum Nachweis von Protein-DNA-Komplexen in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen wurde die P³²-markierte murine AP1/E-Box (A/E)-Sonde mit Zellkernprotein aus RAW264.7 und NIH3T3 Zellen inkubiert und mit kalten Kompetitoren die spezifische Bindung nachgewiesen. Um beteiligte Transkriptionsfaktoren identifizieren zu können, wurden mutierte Oligonukleotide der AP1/E-Box, Sonden mit Konsensussequenzen möglicher Transkriptionsfaktoren oder spezifische Antikörper zugegeben (Tabelle 4-1).

	E-Box	AP-1
McA/E	AAGCCCAGAGGTCAGAT	TCCTGGGAT
HcA/E	AAGCCCAGGCAGAGGTCAGAT	TGACTAATTGGGAT
mA/E1	AAGCCCAGAGGTCAGAT	GTACTTCCTGGGAT
mA/E2	AAGCCCAGAGGTC	GAAATGACTTCCTGGGAT
mA/E3	AAGCCCAGAGT	TCAGATGACTTCCTGGGAT
mA/E4	AAGCCCAGAGGTCAGAT	TGACTTAAATGGGAT
mA/E5	AAGCCCAGAGGTCAGAT	TGACTTCCGTGGAT
mA/E6	AAGCCC	TCAGGTCAGATGACTTCCTGGGAT
mA/E13	AAGCCCAGAGT	TCAGAGTACTTCCTGGGAT
cMBox	GAAAAAGTTAGTCATGTGCTTGCGAGAAGA	
cUSF	CACCCGGTCACGTGGCCTACACC	
cTFE3	GATCTGGTCATGTGGCAAGGC	
cAP1	CGCTTGATGACTCAGCCGGAA	
cCREB	AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG	

Tabelle 4-1. Kompetitor-Sequenzen für EMSA

Die im murinen AP1/E-Box (A/E) EMSA als kalte Kompetitor verwendeten Oligonukleotide sind von 5' nach 3' Richtung angegeben. Mc/Hc bezeichnet die murine bzw. humane Wildtyp-Sequenz, Mutationen (mA/E1-6 und 13) sind durch fette Buchstaben hervorgehoben und cMBox-cCREB sind Konsensus Oligonukleotide der jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Die E-Box Konsensussequenz ist grau hinterlegt, die AP1-Bindestelle umrahmt.

In Abbildung 4-19 ist das Ergebnis der EMSA-Analyse mit Kernextrakten aus NIH3T3 Fibroblastenzellen, in denen ausschließlich der distale *Tlr4* Promotor benutzt wird, gezeigt.

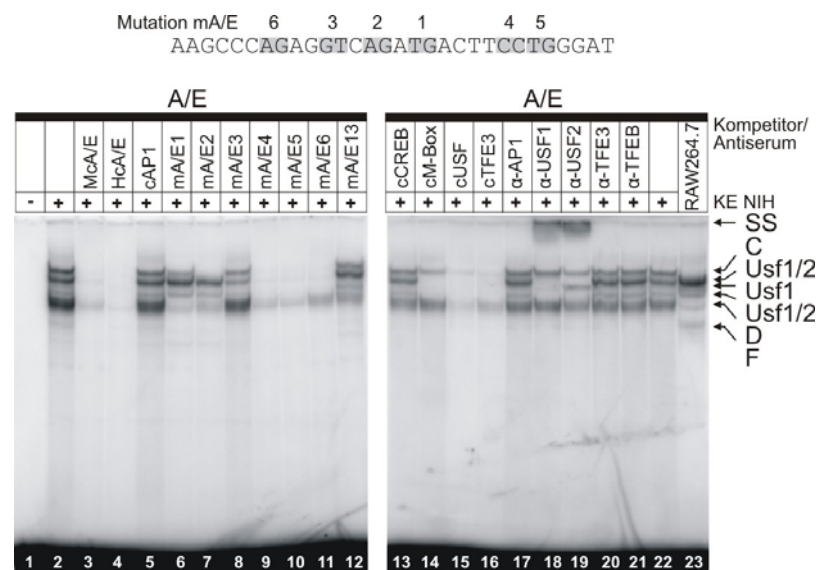


Abbildung 4-19. EMSA der AP1/E-Box (A/E) mit NIH3T3 Kernextrakt

Unter Verwendung einer P^{32} -gelabelten Sonde A/E wurde ein Gelshift mit Kernextrakten aus NIH3T3 (Spur 2-22) und RAW264.7 (Spur 23) Zellen durchgeführt. Kalte Kompetitor der murinen (Spur 3) oder humanen (Spur 4) Wt-Sequenz, Konsensussequenzen (Spur 5, 13-16) und der mutierten A/E-Oligonukleotide (Spur 6-12) wurden im 100x Überschuß zugegeben. Usf1/2 enthaltende Komplexe, unbekannte (C, D, F) Komplexe und Supershifts (SS) nach Zugabe von Antiserum (Spur 17-20) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das sehr unterschiedliche Bandenmuster resultierend aus der Inkubation der AP1/E-Box Sonde mit Kernprotein aus NIH3T3 (Spur 2-22) und RAW264.7

(Spur 23), lässt bereits auf eine Zelltyp-spezifische Besetzung mit DNA-Bindeproteinen schließen. Die Zugabe kalter Kompetitoren der murinen und humanen Wt-Sequenz (McA/E, HcA/E) zeigte, dass keine Spezies-spezifischen Unterschiede in der Sequenz vorliegen, da in beiden Fällen die Komplexbildung mit der markierten Sonde verhindert werden konnte. Eine Bindung von AP1 oder CREB (cAMP Response Element (CRE)-Binding-Protein), ein strukturverwandter Transkriptionsfaktor von Myc, ist unwahrscheinlich, da weder das Konsensus-Oligonukleotid cAP1 noch cCREB kompetierend wirkte. Eine weitere Bestätigung dafür ist, dass auch nach Inkubation mit Antiserum gegen AP1 kein Supershift nachgewiesen wurde. Dagegen gaben die mit USF-Antiseren erzeugten Supershifts Hinweise auf die Bindung von Usf1 und Usf2 an den *Tlr4* Promotor. Durch die spezifische Antikörperbindung an die USF-Faktoren konnten die in Abbildung 4-19 gezeigten Usf1/2 enthaltenden Komplexe entschlüsselt werden. Die Komponenten der Komplexe C und D konnten nicht identifiziert werden. Weitere Konkurrenzexperimente zeigten, dass das Konsensus-Oligonukleotid cM-Box nur Komplexe mit den USF-Faktoren bilden kann. Dagegen kompetierten cUSF und cTFE3 auch um die Proteine aus den Komplexen C und D. Beim Sequenzvergleich der Kompetitoren fiel auf, dass das Nukleotidtriplett 5'-GGT-3' stromaufwärts des E-Box-Motivs in cUSF, cTFE3 und der Wt-Sequenz konserviert ist, aber im M-Box Kompetitor fehlt. Folglich muss dieser Sequenzabschnitt für die Transkriptionsfaktoren in Komplex C und D von Bedeutung sein.

Durch eine Abfolge von Dinukleotidaustauschen im kalten murinen Kompetitor wurde die für Proteinbindungen wichtige DNA-Sequenz weiter untersucht. Mutationen innerhalb der E-Box (mA/E1 und mA/E2) führten zum Verlust der Bindung der USF-Faktoren. Das mutierte Triplet 5'-GGT-3' in mA/E3 und zum Teil auch die Mutation in mA/E6 verhinderten die Proteinbindung, die zur Bildung des Komplexes D führt. Der unbekannte Komplex C wurde zum einen durch die E-Box Mutation mA/E1 und zum anderen durch den Nukleotidaustausch in mA/E3 verhindert. Bei einer gleichzeitigen Mutation von mA/E1 und mA/E3 konnte weder USF noch Protein aus Komplex C an die DNA binden.

Dagegen scheinen die mit RAW264.7 Makrophagen Kernextrakt zustandegekommenen DNA-Protein-Komplexe hauptsächlich aus USF-Faktoren zu bestehen (Abbildung 4-20). Im Gegensatz zum Effekt der USF-Antiseren im

EMSA mit Fibroblasten-Kernextrakt (Abbildung 4-19), verschwand der Großteil der Komplexe im Supershift mit den gegen USF1 und USF2 gerichteten Antikörpern fast vollständig. Die Spezies-spezifisch gebildeten Komplexe E und F setzen sich aus unbekannten Komponenten zusammen. Auch in Makrophagen scheint der Transkriptionsfaktor AP1 nicht an der *Tlr4* Regulation beteiligt zu sein, da kein Supershift nachgewiesen werden konnte und auch der Konsensus-Kompetitor cAP1 unwirksam war (nicht gezeigt). Die Antiseren der Mitf-Transkriptionsfaktoren TFE3 und TFEB gaben weder im EMSA mit NIH3T3 noch mit RAW264.7 Kernextrakt einen Hinweis auf ihre Bindung an die E-Box.

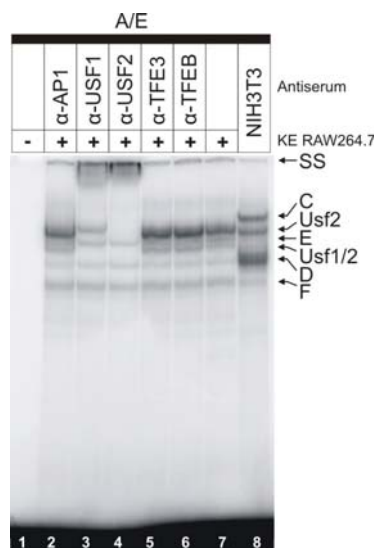


Abbildung 4-20. Supershift der AP1/E-Box (A/E) mit RAW264.7 Kernextrakt

Unter Verwendung einer P^{32} -gelabelten Sonde A/E wurde ein Gelshift mit Kernextrakten (KE) aus RAW264.7 (Spur 2-7) und NIH3T3 (Spur 8) Zellen durchgeführt. Die Zugabe der Antikörper (Spur 2-6) ist angegeben und daraus resultierende Supershifts (SS) sowie spezifische DNA-Protein Komplexe mit Pfeilen gekennzeichnet (USF1/2, C-F unbekannt).

Diese *in vitro* Studie deutete darauf hin, dass E-Box-bindende Faktoren und nicht AP1 eine Rolle am distalen Promotor spielen. Neben den nachgewiesenen USF-Faktoren, die besonders in Makrophagen an der E-Box dominieren, konnten keine weiteren für die Expression in nicht-myeloischen Zellen verantwortliche Faktoren identifiziert werden.

4.2.8.3 Überexpressionsanalysen

Zur weiteren Aufklärung des Einflusses E-Box-bindender Proteine auf die Transkription wurden mit RAW264.7 und NIH3T3 Zellen Kotransfektionen mit Expressionsplasmiden für wildtypische oder dominant-negative Transkriptionsfaktoren und dem pGL4-Reporterkonstrukt des distalen *Tlr4* Promotors (dmWt) durchgeführt. Die dominant-negativen Faktoren (A-Konstrukte)

kompetierten mit Transkriptionsfaktoren aus der Mitf-Familie (A-Mitf), USF-Faktoren (A-USF) oder dem Max-Faktor (A-Max). Um einen möglichen positiven Effekt einer Transaktivierung zu messen, wurden TFEB, TFE3 oder USF in den beiden Zelllinien überexprimiert (Abbildung 4-21).

Im Gegensatz zu den EMSA-Analysen (4.2.8.2) wurde ein konzentrationsabhängiger, reprimierender Effekt des dominant-negativen Mitf-Faktors, nicht aber des dominant-negativen USF-Faktors festgestellt. Mit diesem Transfektionsergebnis übereinstimmend waren die Überexpressionsexperimente, in denen sich nur die Mitf-Faktoren TFEB und TFE3 positiv auf die Reporteraktivität auswirkten. In der Makrophagenzelllinie RAW264.7 wurde die Luziferaseaktivität bei Anwesenheit des dominant-negativen Faktors A-Mitf konzentrationsabhängig auf 20% gesenkt und die Koexpression von TFE3 bewirkte eine dreifache Aktivitätszunahme des *Tlr4* Promotors. Im Gegensatz dazu waren die Konsequenzen der Überexpression bei der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 weniger ausgeprägt (A-Mitf: 50%, TFE3: 2x). In beiden Zelllinien beeinflusste weder die Expression von USF1 oder USF2a noch von beiden Faktoren zusammen die Reporteraktivität.

Der Inhibitor des Max-Faktors A-Max, der ursprünglich als Negativkontrolle eingesetzt wurde, weil keine Bindung an die DNA erwartet wurde, führte bei den NIH3T3 Zellen überraschenderweise zu einer 1,5-fachen Erhöhung der Reporteraktivität. Eine mögliche Erklärung ist, dass Max, ein Dimerisierungspartner für bHLH-Proteine, als indirekter Repressor wirkt, da er keine Aktivierungsdomäne besitzt. Als Kontrolle der Spezifität der E-Box als Bindemotiv wurde das AP1/E-Box mutierte *Tlr4* Reporterplasmid (dmA/E1) eingesetzt, das wie erwartet keine Aktivität zeigte.

Diese Ergebnisse bestätigten den Einfluss der konservierten AP1/E-Box und die Rolle der E-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren in der Regulation des distalen Promotors. Allerdings scheint die Aktivierung nicht, wie in den EMSA-Analysen angedeutet, durch USF-Faktoren sondern vielmehr durch Mitglieder der Mitf-Familie, nämlich TFE3 und TFEB, vermittelt zu sein.

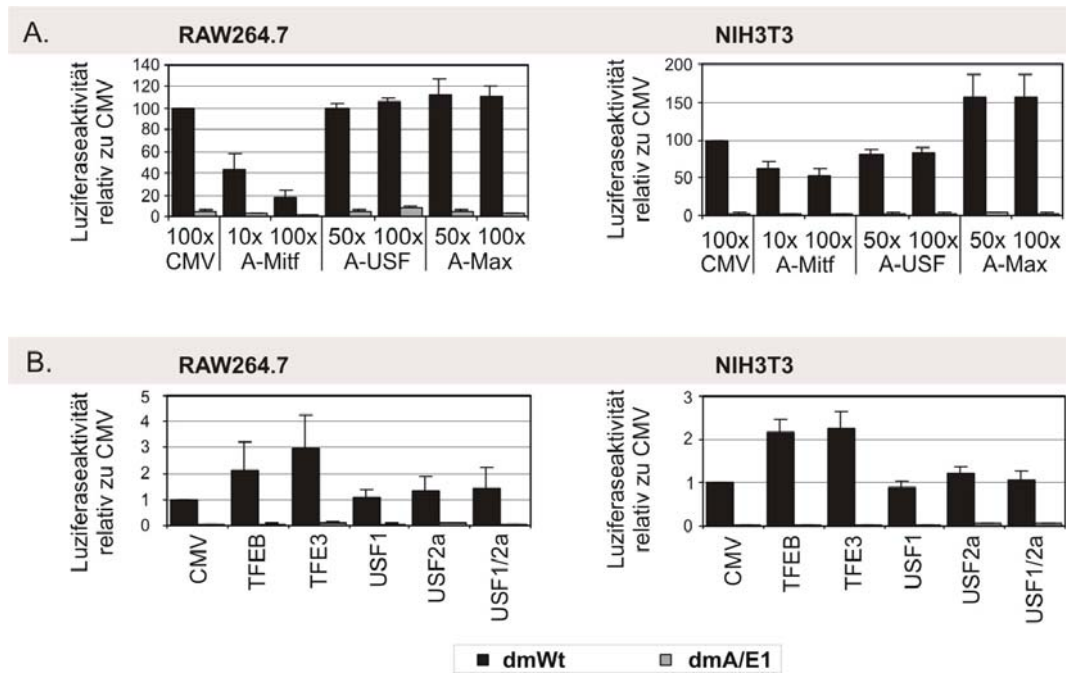


Abbildung 4-21. Kotransfektions-Reporteranalysen in RAW264.7 und NIH3T3 Zellen

Luziferase-Assay des pGL4-Reporterkonstruktes mit dem distalen *Tlr4* Promotors (dmWt) nach Kotransfektion mit dominant-negativen Transkriptionsfaktoren A-Mitf, A-USF und A-Max (A.) und Wildtyp-Transkriptionsfaktoren TFEB, TFE3, USF1 und USF2a (B). Die Ergebnisse sind relativ zu dem Ansatz pGL4-dmWt mit dem leeren Expressionsvektor (100x CMV) dargestellt. Für die Titration wurde 1/10 (10x) oder 1/2 (50x) einer konstanten DNA Menge (100x) vom Expressionsplasmid verwendet und der fehlende DNA-Anteil mit dem leeren CMV-Vektor aufgefüllt. Zur Kontrolle wurden alle Kotransfektionen mit einem mutierten pGL4-Reporterkonstrukt (dmA/E1) durchgeführt. Die Luziferasewerte + SD wurden mit Renilla-Luziferasewerten normalisiert und aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

4.2.9 Quantifizierung von Transkriptionsfaktoren am *Tlr4* Promotor

Mittels *in vivo* Footprinting konnten die in lebenden Zellen besetzten Transkriptionsfaktor-Bindestellen des *TLR4* Promotors festgestellt werden (siehe Kapitel 4.2.6). Jedoch können durch diese Methode keine Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Um festzustellen, welche Faktoren mit dem *TLR4* Promotor *in vivo* assoziiert sind, wurden Chromatin-Immunpräzitationen (ChIP) durchgeführt. Dazu werden die Proteine *in vivo* durch Formaldehyd an die DNA fixiert und das kovalent vernetzte Chromatin durch Ultraschall fragmentiert. Anschließend erfolgt eine Immunpräzitation mit geeigneten, gegen Transkriptionsfaktoren gerichteten Antikörpern. Daran gebundene DNA-Fragmente werden mit einer quantitativen Real-time-PCR nachgewiesen.

ChIP Experimente wurden in BMM, der myeloischen Zelllinie RAW264.7 sowie der nicht-myeloischen NIH3T3 Zelllinie durchgeführt. Die fixierte, fragmentierte

DNA wurde mit Antikörpern gegen den myeloischen und B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor PU.1, die USF-Faktoren USF1 und USF2 sowie den Mitf-Faktoren TFEB und TFE3 immunpräzipitiert.

Die in Abbildung 4-22 zusammengestellte Quantifizierung aller am *Tlr4* Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren erfolgte mit zwei Primerpaaren, die in der Region des distalen (-250 - -90) und proximalen (-20 - +111) TSS liegen. Als Kontrolle für aktive Transkription wurde auch die Anwesenheit der RNA-Polymerase II (Pol II) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die RAW264.7 Makrophagen eine den BMM sehr ähnliche Promotorbesetzung aufweisen.

In dem Präzipitationsansatz mit dem PU.1 Antikörper wurde die höchste Anreicherung im Vergleich zur präzipitierten DNA-Menge mit dem IgG Kontrollantikörper gezeigt. Aufgrund der Häufigkeit dieser Ets/PU.1-Bindestelle im *Tlr4* Promotor war eine starke Präsenz von PU.1 vorhersehbar. Wie erwartet, konnte mit DNA aus PU.1-defizienten Fibroblasten (NIH3T3) keine Bindung dieses Ets-Faktors gezeigt werden. In der analysierten DNA aus Makrophagen (BMM und RAW264.7) konnten beide USF-Faktoren am *Tlr4* Promotor nachgewiesen werden, wobei die Bindung von Usf2 deutlicher war.

Im Widerspruch zur zuvor gezeigten Bindung im EMSA (Abbildung 4-19), war in der NIH3T3 Zelllinie keine Bindung von Usf1 und kaum Usf2 am Promotor detektierbar. Bezüglich der Mitf-Faktoren TFEB und Tfe3, die aufgrund ihrer aktivierenden Eigenschaften in den Kotransfektionsexperimenten gute Kandidaten für eine Bindung an die E-Box waren (Abbildung 4-21), kann keine Aussage gemacht werden.

Vermutlich waren die verwendeten Antikörper nicht ChIP tauglich oder die Präzipitationsbedingungen (ProteinA-/ProteinG-Sepharose) waren nicht optimal, um eine Bindung an den *Tlr4* Promotor oder den in der Literatur beschriebenen *CDH1* (E-Cadherin) Promotor nachzuweisen (Huan, C. et al. 2005).

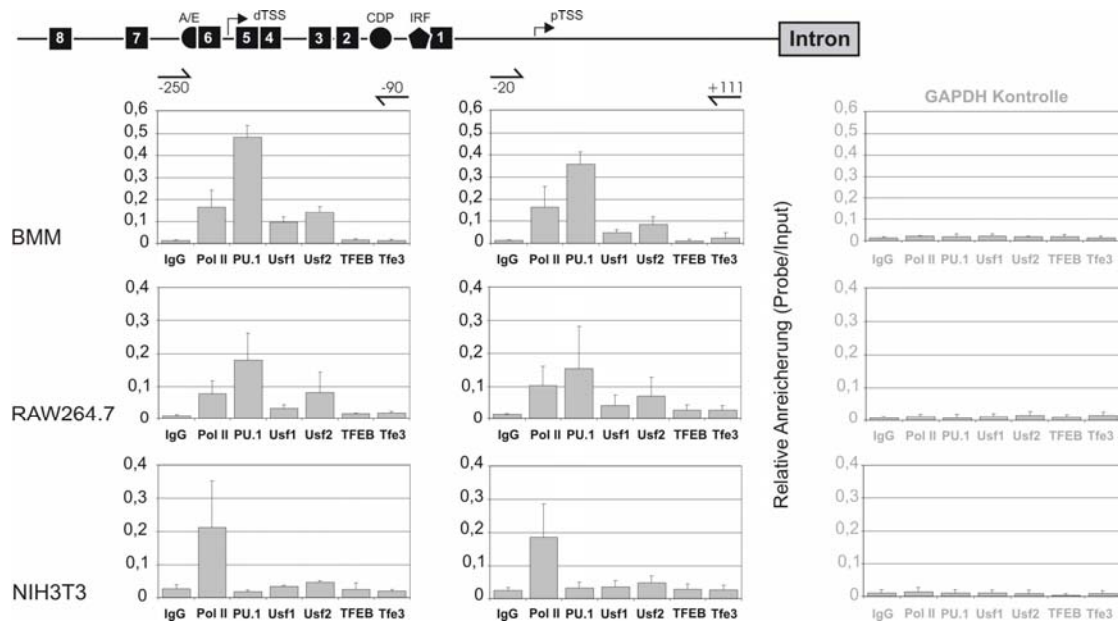


Abbildung 4-22. ChIP Analyse des murinen *Tlr4* Promotors

Durch ChIP Experimente wurde die quantitative Bindung von den angegebenen Transkriptionsfaktoren an den *Tlr4* Promotor in BMM C57B/6 und den Zelllinien RAW264.7 sowie NIH3T3 gemessen. Die schematische Darstellung des *Tlr4* Promotors (siehe auch Abbildung 4-7) verdeutlicht die Lage der Primerpaare, die zur Quantifizierung mittels Real-Time-PCR verwendet wurden. Die Primer -250 - -90 (s und as) amplifizieren die Region des distalen TSS (dTSS) und die Primer -20 - +111 (s und as) den Bereich des proximalen TSS (pTSS). Die Real-time PCR Werte + SD sind relativ zu 5% der in die Präzipitation eingesetzten DNA (Input) und wurden aus drei Experimenten gemittelt. Die IgG Kontrolle entspricht dem Hintergrund durch unspezifische Bindung und die GAPDH Kontrolle zeigt vernachlässigbare Varianzen zwischen den Einzelpräparationen.

Allgemein wurde mit dem stromaufwärtsliegenden Primerpaar eine höhere DNA-Anreicherung mit den jeweiligen Antikörpern gemessen, da die meisten Bindestellen innerhalb dieser amplifizierten Sequenz (-250 - -90) liegen. Da die beiden Primerpaare eng benachbart und die in die Präzipitation eingesetzten DNA-Fragmente durchschnittlich 500 bp groß sind, werden gebundene Transkriptionsfaktoren in geringerem Maße auch mit dem stromabwärtsliegenden Primerpaar nachgewiesen. Durch die ChIP Experimente konnte gezeigt werden, dass die in den EMSA-Analysen dominierenden USF-Faktoren in NIH3T3 Zellen am *Tlr4* Promotor nicht detektierbar sind, aber kleine Mengen Usf1 und Usf2 am *Tlr4* Promotor in BMM und RAW264.7 Zellen vorhanden sind. Die Ergebnisse der Kotransfektionen sprechen für eine Beteiligung der Mitf-Faktoren TFEB und Tfe3 an der *TLR4* Transkription. Entsprechende Hinweise müssen aber noch *in vivo* bestätigt werden und die Suche nach Komponenten der EMSA Komplexe C und D (Abbildung 4-19), die vermutlich zur Regulation des distalen Promotors beitragen, muss weiter fortgesetzt werden.

4.3 Analysen der Chromatinstruktur

Für die Expression eines Gens spielt nicht nur das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren eine Rolle, sondern auch der epigenetische Status eines Genlokus. Inaktive Gene befinden sich in dicht gepacktem Chromatin und sind für Transkriptionsfaktoren unzugänglich. Die Aktivierung Differenzierungs- und Zelltyp-spezifischer Gene durch eine koordinierte, dynamische Veränderung der Chromatinstruktur ist bereits gut untersucht. Dabei werden durch Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren enzymatische Komplexe an den Genlokus rekrutiert, welche diese epigenetischen Prozesse ausführen. Dazu gehören die globale Reorganisation der Chromatinarchitektur und die Modifizierung N-terminaler Arme der Histone durch Histonacetylasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC). Während methylierte Histone inaktives Chromatin kennzeichnen, erfolgt durch Hyperacetylierung der Histone eine Auflockerung des Chromatins und ermöglicht die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren (Fischle, W. et al. 2003). Eine weitere mit aktiven Genen assoziierte Modifikation ist die Methylierung am Lysin 4 des Histon H3 (H3K4). Dabei wurde gezeigt, dass di- und trimethyliertes Lysin, aber nicht monomethyliertes Lysin den Chromatin-Umstrukturierungskomplex ISWI mit hoher Affinität bindet (Santos-Rosa, H. et al. 2002). In Hefe und Eukaryoten wurde beschrieben, dass die RNA-Polymerase II eine Methyltransferase rekrutiert und so trimethylierte Histone zurücklässt (Ng, H. H. et al. 2003). Darüberhinaus verhindert methyliertes H3K4 die Bindung von Heterochromatin-Silencer Faktoren (Santos-Rosa, H. et al. 2003). Außerdem können Gene durch die Positionierung von Nukleosomen reguliert werden. Die meisten Transkriptionsfaktoren binden an Nukleosomen-freie Regionen, so dass eine Nukleosomenverschiebung von nur wenigen Basenpaaren ausreichen kann um die Bindung von Faktoren zu beeinflussen (Lomvardas, S. and Thanos, D. 2002).

In murinen Zellen wurde gezeigt, dass abhängig vom Zelltyp der distale oder proximale *Tlr4* Promotor benutzt wird. Durch welchen Promotor letztlich die Transkription erfolgt, hängt zum einen von den vorhandenen Transkriptionsfaktoren ab und/oder könnte auch von der Chromatinarchitektur am *Tlr4* Promotor reguliert werden. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen der Histonmodifikationen an beiden Promotoren durchgeführt.

Mit ChIP Experimenten wurden die bekannten Merkmale aktiver Transkription, nämlich der Acetylierungsstatus der Histone H3 und H4 (AcH3 und AcH4) und der Methylierungsgrad von Lysin 4 (diMeH3 und triMeH3), in BMM und in den murinen Zelllinien RAW264.7 und NIH3T3 untersucht. Eine quantitative Real-time-PCR wurde mit den zuvor beschriebenen Primerpaaren durchgeführt.

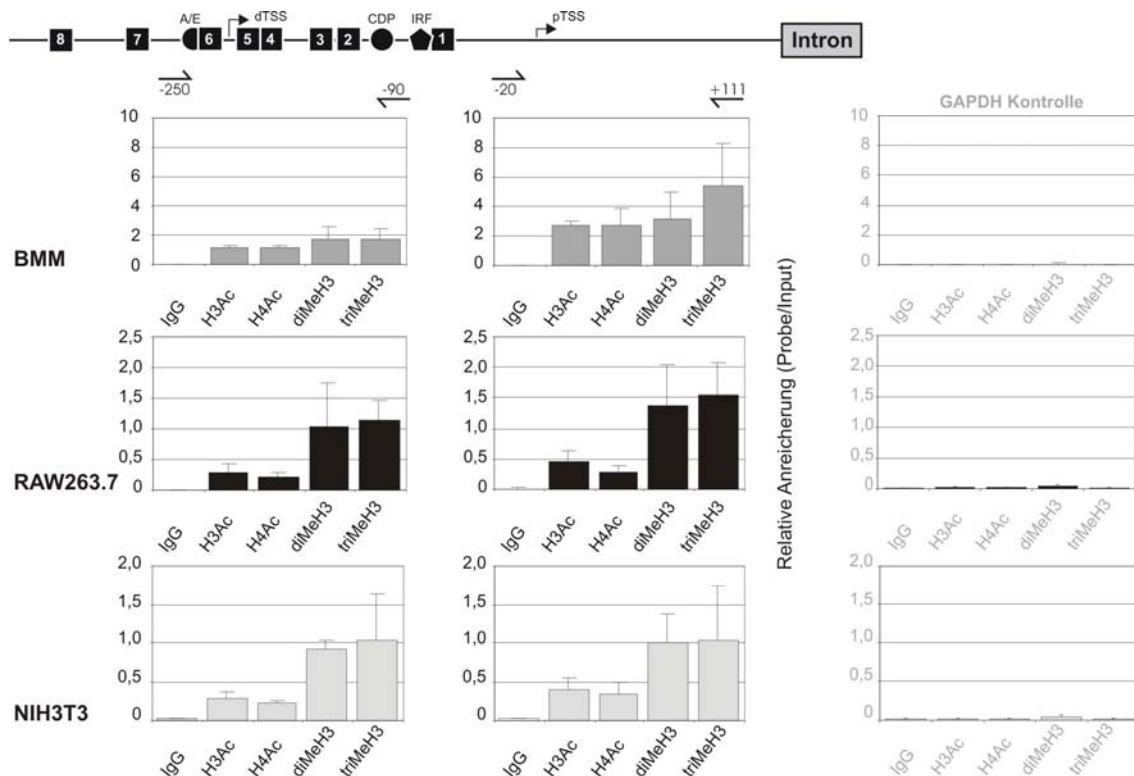


Abbildung 4-23. ChIP-Analysen der Histonmodifikationen am *Tlr4* Promotor

Fixierte, fragmentierte DNA aus BMM (C57B/6), RAW264.7 und NIH3T3 wurde mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon 3 und Histon 4 (H3Ac und H4Ac) sowie di- oder tri-methyliertes Lysin 4 des Histon 3 (diMeH3, triMeH3) immunpräzipitiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Real-time-PCR am distalen (-250 - -90) und proximalen (-20 - +111) Promotor. Oberhalb der Diagramme ist der murine Promotor mit den benutzten Primerpaaren schematisch dargestellt und die TSS mit Pfeilen markiert (dTSS, pTSS). Die IgG Kontrolle zeigt jeweils eventuelle unspezifische Bindungen und GAPDH wurde zur Kontrolle für eine konstante DNA Menge in den Einzelpräzipitationen gemessen. Die Real-time PCR Werte + SD sind relativ zu 5% der in die Präzipitation eingesetzten DNA (Input) und wurden aus drei Experimenten gemittelt.

Unterschiede in den Modifikationen zwischen den beiden Promotoren konnten nur in den primären Zellen gezeigt werden. In BMM, die ausschließlich den proximalen Promotor verwenden, waren die Histone in dieser Region (-20 - +111) am stärksten modifiziert. Besonders die Trimethylierung am Histon 3 (triMeH3) war dreimal so hoch als in der Region des nicht-myeloischen Promotors (-250 - -90) und deutet auf eine größere Menge an RNA-Polymerase II hin. In den Zelllinien RAW264.7 und NIH3T3 war die Anreicherung der präzipitierten DNA insgesamt

viel geringer und es konnten keine signifikanten Unterschiede der Histonmodifikationen zwischen den untersuchten Regionen nachgewiesen werden. Möglicherweise konnte durch den Einsatz von im Mittel 500 bp großen DNA-Fragmenten in die Immunpräzipitation keine Auflösung der beiden Promotoren, die nur ca. 200 bp auseinander liegen, erreicht werden. Allerdings wurde in RAW264.7 Zellen zum Teil auch der distale Promotor benutzt, so dass eine ähnliche Histonmodifikation am proximalen und distalen Promotor vorstellbar ist. Die geringere Anreicherung der Histonmodifikationen könnte entweder mit einer schlechteren Modifikationsrate der Histone in den Zelllinien oder mit dem völligen Verlust von Nukleosomen in dieser Region zusammenhängen.

Die Unterschiede zwischen Zelllinien und BMM deuten aber auf eine höhere Aktivität des proximalen Promotors in BMM hin, wobei für eine richtige Interpretation noch Untersuchungen zu der Gesamtmenge an modifizierten und unmodifizierten Histonen durchgeführt werden müssen.

Erste Versuche wurden unternommen, die Nukleosomenorganisation am *Tlr4* Promotor mittels MNase Footprinting zu untersuchen. Die Methode konnte aber aufgrund von Zeitmangel nicht hinreichend etabliert werden um eindeutige Aussagen machen zu können.

4.4 *Tlr4* Regulation in PUER Zellen

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den bisher untersuchten Zelltypen ist die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1. Während PU.1 ein sehr wichtiger Differenzierungsfaktor in myeloischen Zellen ist, wird er in nicht-myeloischen Zellen nicht exprimiert. Viele der bislang durchgeführten Experimente haben bereits gezeigt, dass durch PU.1 ein entscheidender Einfluss auf die Transkription von *TLR4* ausgeübt wird.

Oftmals ist es schwierig, verschiedene Zelltypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe oder Kultivierung miteinander zu vergleichen. Aus dem Labor von H. Singh wurde uns freundlicherweise eine dort generierte Zelllinie (PUER) zur Verfügung gestellt, die es uns ermöglicht hat Genregulation durch PU.1 zu untersuchen. Die IL-3-abhängige PUER Zelllinie geht aus einer PU.1-defizienten hämatopoetischen Vorläuferzelle hervor, die mit einem Retrovirus stabil transduziert wurde. Das Transgen setzt sich aus dem *Spi-1* Gen (PU.1 kodierende Sequenz) und der Hormon-Bindedomäne des Estrogenrezeptors (ER) zusammen (Abbildung 4-24).

PU.1 wird als Fusionsprotein konstitutiv in der Zelle exprimiert. Im inaktiven Zustand ist die Hormon-Bindedomäne des Fusionsproteins mit zytoplasmatischem Hsp90 (Heat shock protein 90) komplexiert und liegt im Zytoplasma vor. Nach Stimulation mit dem Estrogenanalogon Tamoxifen (OHT) bindet dieses an den Rezeptor und führt zur Dissoziation von Hsp90. Der freigewordene Rezeptor ermöglicht die Translokation des PU.1-Fusionsproteins in den Kern und die Aktivierung von PU.1-induzierbaren Genen.



Abbildung 4-24. PUER Vektorkonstrukt

Schematische Struktur des retroviralen, PU.1 kodierenden MSCV-PAC-Vektors: TA, Transaktivierungsdomäne; PEST, Zwischendomäne von PU.1; ETS, DNA-Bindedomäne; ERTM, Tamoxifen Response Element. Abbildung nach (Walsh, J. C. et al. 2002)

Nach der konditionellen Aktivierung differenzieren die Vorläuferzellen zu morphologisch adhären Makrophagen. In diesem Modellsystem wurde die Abhängigkeit der Expression des LPS-Rezeptors *Tlr4* in Abhängigkeit von PU.1 untersucht.

4.4.1 *Tlr4* Expression

Zunächst wurde die *Tlr4* mRNA Expression in PUER Zellen in einer Kinetik über 48 Stunden nach Zugabe von Tamoxifen (OHT) gemessen.

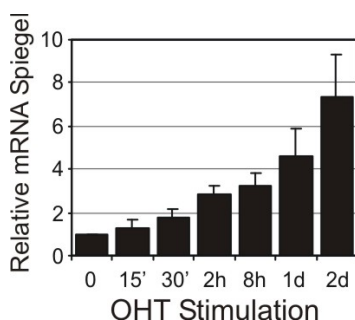


Abbildung 4-25. RT-Analyse der *Tlr4* Expression in PUER Zellen

PUER Zellen wurden mit 100 nM OHT versetzt und in einer Kinetik zu den angegebenen Zeitpunkten auf *Tlr4* mRNA Expression untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit Real-time-PCR und die *Tlr4* Spiegel wurden auf *HPRT* Expression normalisiert. Quantitative Werte + SD sind relativ zum Wert bei Zeitpunkt 0 und wurden aus mindestens drei Experimenten gemittelt.

Die Abbildung 4-25 zeigt, dass bereits 15 Minuten nach PU.1 Aktivierung ein Anstieg der *Tlr4* Expression zu verzeichnen war. Nach nur 30 Minuten wurde eine Verdoppelung und nach zwei Tagen sogar eine 7-fach erhöhte Expression gemessen.

4.4.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte nach Stimulation

Um eine mögliche Abhängigkeit der TLR4 TSSs von PU.1 zu untersuchen, wurden 5'-RACE-PCR-Analysen in unstimulierten, PU.1-negativen PUER Zellen und zu mehreren Zeitpunkten nach Tamoxifen Zugabe durchgeführt (Abbildung 4-26).

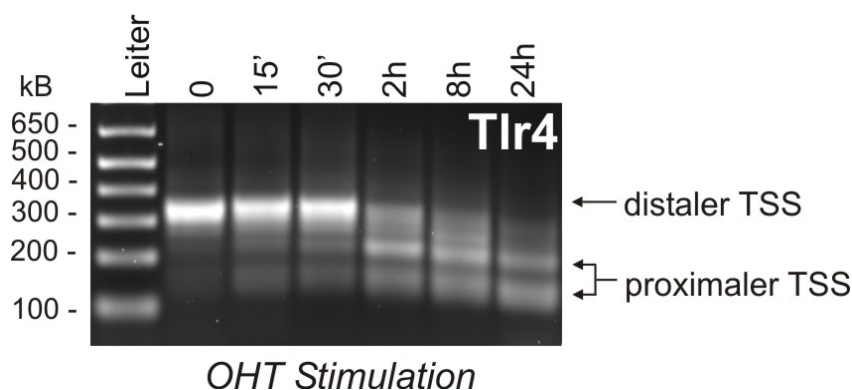


Abbildung 4-26. Kinetik der TSS des *Tlr4* Promotors nach PU.1 Aktivierung in PUER Zellen

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die nach Tamoxifen(OHT)-Zugabe (100 nM) zur Differenzierung angeregten PUER Zellen mittels einer 5'-RLM-RACE-PCR auf ihre *Tlr4* TSSs untersucht. Die amplifizierten 5'-Enden wurden über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die proximalen TSSs und der 200 bp stromaufwärts liegende distale TSS sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In unbehandelten Zellen wurde ausschließlich der distale TSS detektiert. Schon 15 Minuten nach OHT-Zugabe war eine Verschiebung der Startpunkte sichtbar, bis zur alleinigen Initiation der Transkription am proximalen Promotor nach 24 Stunden. Die proximalen TSSs stimmen mit denen in primären Makrophagen überein, während der distale TSS dem der nicht-myeloischen Zellen entspricht (Abbildung 4-9).

Es konnte also gezeigt werden, dass durch die alleinige Aktivierung von PU.1 eine Verschiebung des TSS induziert wird. Wie aus Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26 ersichtlich ist, geht in den PUER Zellen mit der Verschiebung des distalen zum proximalen TSS auch eine starke Erhöhung der *Tlr4* Expression einher.

4.4.3 Transkriptionsfaktor-Bindung und Histonmodifikationen am *Tlr4* Promoter in PUER Zellen

Um mehr über die Besetzung des *Tlr4* Promotors mit Transkriptionsfaktoren *in vivo* und besonders über Änderungen während des Promotorwechsels bei den mit OHT-stimulierten PUER Zellen zu erfahren, wurden ChIP Kinetiken durchgeführt. Die Quantifizierung mittels Real-time-PCR wurde mit den bereits beschriebenen Primerpaaren zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren und modifizierten Histonen am distalen (-250 - -90) und proximalen (-20 - +111) Promotor durchgeführt.

In Abbildung 4-27A. sind die Kinetiken der RNA-Pol II als Nachweis für Transkription, der induzierte Ets-Faktor PU.1 und die E-Box-bindenden Faktoren Usf1 und Usf2 dargestellt.

Präzipitationsansätze mit dem IgG-Antikörper zeigten kaum nachweisbare, unspezifische Bindungen. Bereits 15 Minuten nach Zugabe von OHT war am *Tlr4* Promotor die doppelte Menge an RNA-Polymerase detektierbar. Während bis zu dem Zeitpunkt von 30 Minuten die Besetzung der beiden Promotoren noch gleich stark war, zeigte sich nach zwei Stunden und 24 Stunden ein Rückgang der nachgewiesenen Pol II Assoziation am distalen Promotor und eine tendenziell stärkere Besetzung des proximalen Promotors (vgl. NIH3T3 und RAW264.7, Abbildung 4-22).

Diese Beobachtung korreliert mit der Verschiebung der Transkriptionsstartpunkte in Abbildung 4-26. Der Transkriptionsfaktor PU.1 wurde bei den unstimulierten Zellen am *Tlr4* Promotor nicht nachgewiesen.

Bereits 15 Minuten nach Aktivierung von PU.1 konnte die Rekrutierung an den *Tlr4* Promotor gemessen werden. Die Kinetik zeigte einen weiteren kontinuierlichen Anstieg der PU.1 Bindung mit dem distalen Primerpaar, während mit dem proximalen Primerpaar, in dessen Umfeld keine PU.1-Motive vorhanden sind, deutlich weniger PU.1-Interaktionen detektiert wurden.

Die E-Box-bindenden Faktoren Usf1 und Usf2 waren unabhängig von der Anwesenheit von PU.1 in geringem Maß am Promotor vorhanden.

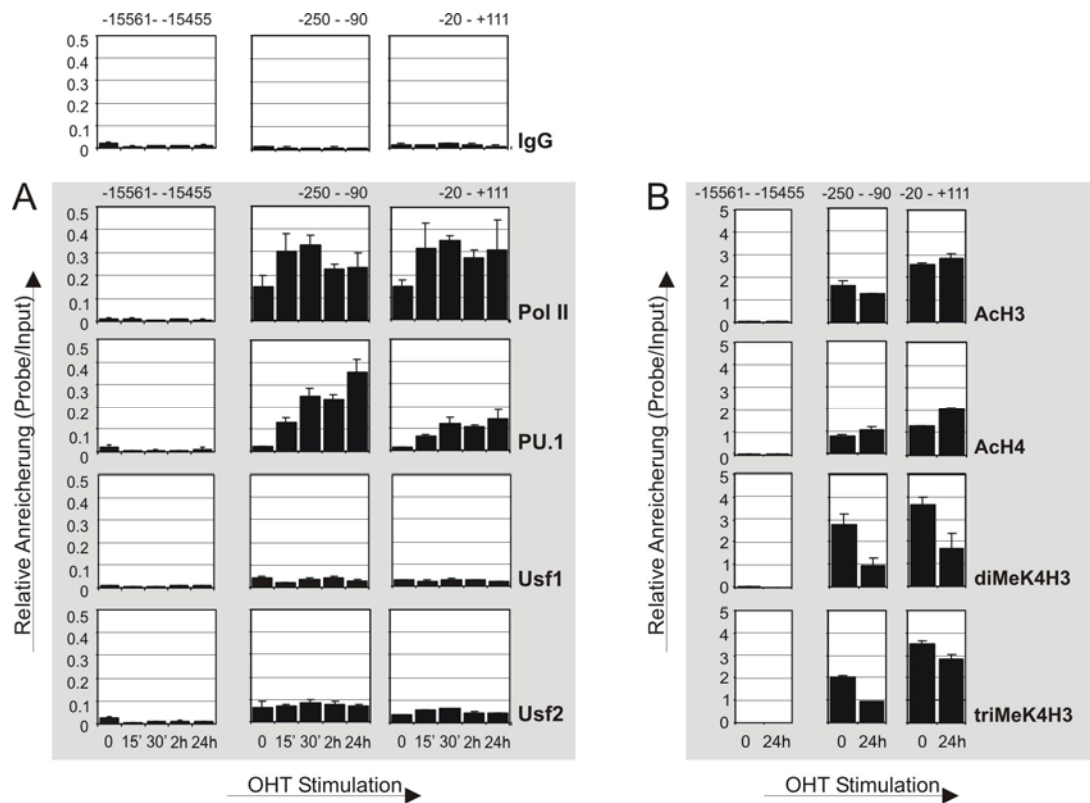


Abbildung 4-27. ChIP-Kinetik der PUER Zellen nach OHT-Aktivierung

A. Chromatin der PUER Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe präpariert und mit dem Kontrollantikörper gegen IgG sowie den Antikörpern gegen RNA-Polymerase II (Pol II), PU.1, USF1 und USF2 immunpräzipitiert. B. Die ChIP Analysen der für Transkription spezifischen Histonmodifikationen (Acetylierung H3 und H4; di- und tri-Methylierung Lysin K4/H3) wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 24 h durchgeführt. Die Quantifizierung der präzipitierten DNA erfolgte mittels Real-time-PCR mit folgenden Primerpaaren: sense und antisense Primer -15561- -15455 liegen außerhalb regulatorischer Regionen des *Tlr4* Gens zur Kontrolle gleicher DNA-Mengen; die Primerpaare zur Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren binden am distalen (-250- -90) und proximalen (-20- +111) Promotor. Die Real-time-PCR Werte + SD wurden aus jeweils Duplikaten zweier unabhängiger Präparationen gemittelt.

Zusätzlich wurde am Anfang (0 h) und am Ende (24 h) der Kinetik (Abbildung 4-27.B) die *Tlr4* Promotorregion auf ihre für Transkription spezifischen Histonmodifikationen untersucht. Während der sehr niedrigen Transkriptionsrate am *Tlr4* Promotor zum Zeitpunkt 0 unterscheiden sich die vorhandenen Histonmodifikationen am distalen und proximalen Promotor kaum. Nach der PU.1-Aktivierung durch die Zugabe von OHT wurde eine Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 nachgewiesen. Die weiteren Marker für aktive Transkription, diMeK4H3 und triMeK4H3, waren nach der Verschiebung des TSS am proximalen Promotor zwei bis dreimal so hoch wie am distalen Promotor. Der Rückgang dieser beiden Modifikationen in den aktiven Zellen zum späten Zeitpunkt (24 h) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (0 h) ist unklar. Wahrscheinlich ist aber ein transkriptionsbedingter Verlust von Histonen für diesen Trend verantwortlich.

4.4.4 Abhängigkeit der TSS bei anderen PU.1-induzierten Genen

Für das *TLR4* Gen konnte mit Hilfe der PUER Zelllinie gezeigt werden, dass durch den Ets-Faktor PU.1 der TSS dominant fixiert wird. In diesem Fall bedeutet der PU.1-induzierte Promotorwechsel schließlich eine Veränderung der Transkriptionsaktivität. Daher stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus möglicherweise eine verbreitete Transkriptionskontrolle zellspezifischer oder differenzierungsabhängiger Gene in Makrophagen darstellt.

In PUER Zellen, die nach PU.1-Aktivierung differenzieren, wurden weitere Gene mit bekannten PU.1-Motiven bezüglich ihrer TSSs nach Stimulation untersucht. In Abbildung 4-28 sind die 5'-RACE-Produkte von CD14, Lipoprotein Lipase (LpL) und Chitinase3-like-3 (Chi3L3) gezeigt. Bei diesen Genen war trotz einer deutlichen Induktion der Expression nach PU.1-Aktivierung keine Veränderung in der Transkriptionsinitiation feststellbar. Die Festlegung des Transkriptionsstarts erfolgt bei diesen Genen wahrscheinlich durch andere Faktoren. Bei dem Gen für den CSF-1 (Colony-Stimulating-Factor 1)-Rezeptor, *c-fms*, ist bekannt, dass ohne PU.1 keine Transkription stattfindet. Dies wurde durch die Ergebnisse der TSS-Analyse in Abbildung 4-28.D bestätigt. Erst acht Stunden nach OHT-Stimulation waren Transkripte mit definiertem TSS nachweisbar.

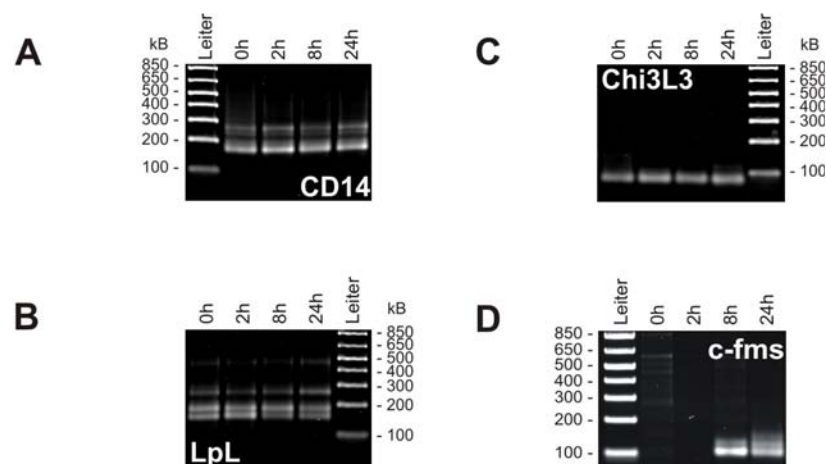


Abbildung 4-28. TSS-Analyse PU.1-regulierter Gene in PUER Zellen

Mittels 5'-RACE-PCR Analysen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe die TSSs in PUER Zellen bestimmt. Mit sequenzspezifischen Primern wurden die TSS von A. CD14, B. Lipoprotein Lipase (LpL), C. Chitinase3-like 3 (Chi3L3) und D. Colony-stimulating-factor 1 Rezeptor (*c-fms*) untersucht.

Unabhängig von der An- oder Abwesenheit von PU.1. waren die 5'-RACE-Produkte bei allen analysierten Genen unverändert. Der dominante Effekt von PU.1 kommt offensichtlich nur bei einzelnen Genen vor.

4.5 Translationale Regulation

Die in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Transfektionsanalysen hatten angedeutet, dass der 3'-Bereich des murinen *Tlr4* Promotors regulatorisch auf die *Tlr4* Expression wirkt. Um eventuell vorhandene Unterschiede in der posttranskriptionellen Regulation zwischen den unterschiedlichen *TLR4* mRNA 5'-Varianten von Mensch und Maus und den verschiedenen TSSs herauszufinden, wurde versucht, posttranskriptionelle Ereignisse von der Transkription zu entkoppeln. Das Schema in Abbildung 4-29 zeigt die für diesen Zweck klonierten Luziferase-Reporterkonstrukte. Dazu wurde die 5'-UTR (Untranslated Region) des *TLR4* Gens mit dem kodierenden Bereich des *Luc* (Luziferase) Gens fusioniert, so dass anstatt der *TLR4* regulatorischen Elemente ein SV40 Promotor strangaufwärts der *TLR4* 5'UTR positioniert war. Die Transkripte der Konstrukte mit der kurzen 5'-UTR entsprechen der in Makrophagen exprimierten mRNA vom proximalen *TLR4* Promotor (SV40-pHuman/Murin 5'UTR) und die Reporterkonstrukte mit der langen 5'-UTR entsprechen der mRNA, die in nicht-myeloischen Zellen vom distalen TSS transkribiert wird (SV40-dHuman/Murin 5'UTR).

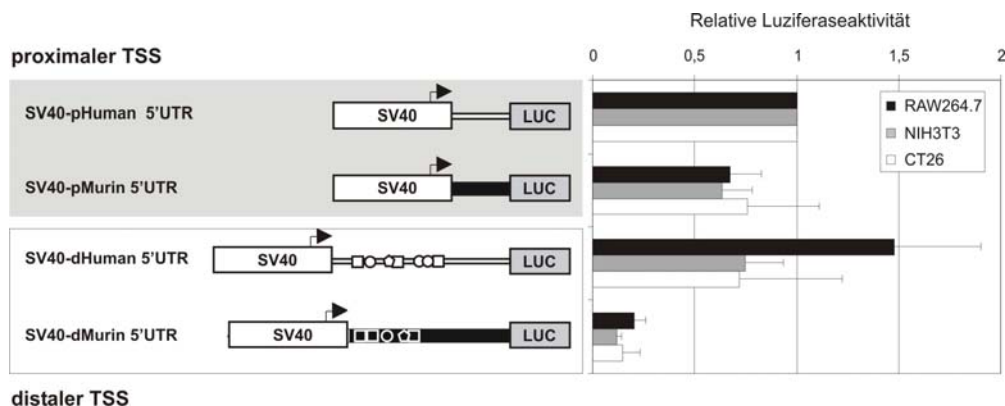


Abbildung 4-29. Luziferase-Assay zur Bestimmung der Translationseffizienz

SV40-p(Human/Murin) Reporterkonstrukte enthalten die *TLR4* 5'-UTR entsprechend dem proximalen TSS und SV40-d (Human/Murin) die *TLR4* 5'-UTR entsprechend dem distalen TSS. Die mit dem starken SV40 Promotor versehenen *TLR4* 5'UTR+LUC Konstrukte wurden in RAW264.7 Makrophagen, NIH3T3 Fibroblasten und CT26 Kolonepithelzellen transient transfiziert und wegen dem gleichen starken SV40 Promotor in allen Konstrukten, sollten die gemessenen Luziferaseaktivitäten auf Unterschiede in der Translation zurückgehen. Die Promotoren sind schematisch dargestellt (weiß: human; schwarz: murin). Die Luzifersewerte + SD wurden mit Renilla-Luziferasewerten normalisiert und sind aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt, dabei sind die Ergebnisse auf das humane Konstrukt mit dem proximalen TSS (SV40-pHuman 5'UTR) bezogen.

Da die *TLR4* 5'-UTR+LUC mRNA Expression von dem sehr aktiven SV40 Promotor des pGL3P-Vektors ausgeht, wurde von einer gleichen Transkriptionsrate aller Konstrukte ausgegangen und die Unterschiede der gemessenen Luziferaseaktivität sollte auf posttranskriptionelle Ereignisse zurückzuführen sein. Die proximalen Promotorkonstrukte (SV40-pHuman/Murin 5'UTR) zeigten eine um 30% geringere Luziferaseaktivität des murinen Konstruktes im Vergleich zum humanen Konstrukt. Noch deutlicher war der Spezies-spezifische Unterschied bezüglich des distalen Promotors (SV40-dHuman/Murin 5'UTR) im Vergleich zum jeweiligen proximalen Promotor. Während die Reporteraktivität des humanen Konstruktes lediglich um 30% zurückging, wurde ein 80%iger Aktivitätsverlust des murinen Reporterkonstruktes nachgewiesen. Die Ergebnisse der Transfektionen waren bis auf eine Ausnahme in allen Zelllinien gleich. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei der Transkription des humanen distalen *TLR4* Promotorkonstruktes (SV40-dHuman 5'UTR) in RAW264.7 Makrophagen auch der interne, proximale *TLR4* Promotor benutzt werden kann und die Reporteraktivität im Gegensatz zu den nicht-myeloischen Zellen verstärkt wurde. Aber auch in den NIH3T3 und CT26 transfizierten Zellen kann ein gewisser Beitrag des internen *TLR4* Promotors zur Reporteraktivität nicht ausgeschlossen werden, da auch in nicht-myeloischen Zellen der humane proximale Promotor verwendet wird.

Dieser experimentelle Ansatz deutete auf eine zum Menschen unterschiedliche *Tlr4* Regulation in der Maus hin. Da die Bedingungen für alle Experimente gleich sind, muss die Ursache für die unterschiedliche Luziferaseaktivität in der Sequenz der beiden Spezies liegen. Dabei wirkt die murine Sequenz im 3'-Bereich des Promotors im Gegensatz zum humanen Promotor inhibierend und Transkripte vom distalen im Vergleich zum proximalen Promotor führten zu einer stark verringerten Luziferaseaktivität. Für diese Effekte könnten posttranskriptionelle Mechanismen und/oder Repressorelemente in der murinen 3'-Region verantwortlich sein.

Beim Sequenzvergleich von Mensch und Maus wurde in der 3'-UTR des murinen *Tlr4* Promotors mehrere *out-of-frame* ATGs identifiziert. Im murinen Promotor sind insgesamt vier und im humanen Promotor drei *out-of-frame* ATGs stromaufwärts vom StartATG vorhanden. Die Ribosomenbindung und Translation von diesen

ATGs würde den Leserahmen verändern und eine Ribosomeninitiation am kodierenden StartATG behindern. Da in der Literatur bereits Beispiele für eine Translationskontrolle durch solche *upstream* ATGs (uATG) beschrieben sind (Child, S. J. et al. 1999), wurde der Effekt von ATG-Mutationen im *TLR4* Promotor mittels Luziferase-Reporterassays untersucht (Abbildung 4-30).

Verschiedene Mutationen der ATGs in der 3'-Region des murinen *Tlr4* Promotors führten bis zu einer zweifachen Erhöhung der Reporteraktivität (M34, M1, M345). Den größten aktivierenden Effekt hatten die mutierten, nicht-konservierten ATGs 3 und 4, während die Mutation aller unmittelbar vor dem StartATG liegenden *out-of-frame* ATGs (M134, M1345) zu einem 50%igen Rückgang der Reporteraktivität führte.

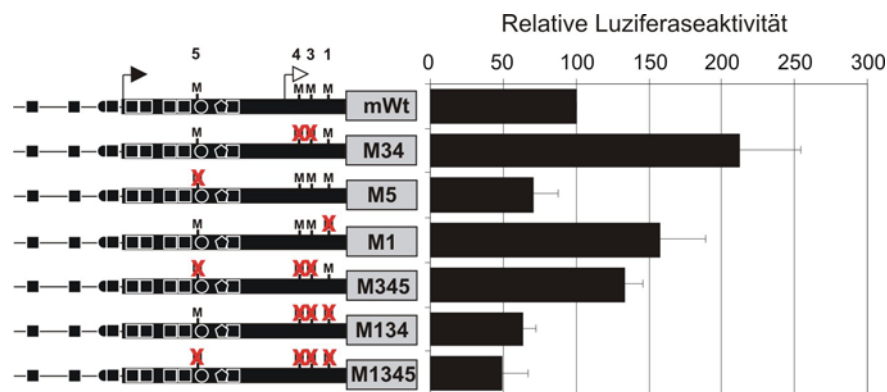


Abbildung 4-30. Out-of-frame ATG-Mutationen im murinen *Tlr4* Reporterkonstrukt

Das murine pGL4-*Tlr4* Wt-Konstrukt und verschiedene ATG-Mutationen (1, 3, 4 und 5) wurden in RAW264.7 Zellen transient transfiziert. Die Nummerierung der ATGs (M) entspricht dem ersten ATG oberhalb dem StartATG (0) und berücksichtigt auch ATGs, die nur in der humanen Sequenz vorhanden sind (M2). Die Luziferasewerte + SD wurden mit Renilla-Luziferasewerten normalisiert und aus mindestens drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Da die *out-of-frame* ATGs 1 und 5 zwischen Mensch und Maus konserviert sind, könnte eine mögliche Abschwächung der *Tlr4* Translation in der Maus an den beiden nicht-konservierten ATGs 3 und 4 liegen. Der Effekt dieser *out-of-frame* ATGs wurde in Transfektionsexperimenten mit verschiedenen Chimärenkonstrukten weiter untersucht.

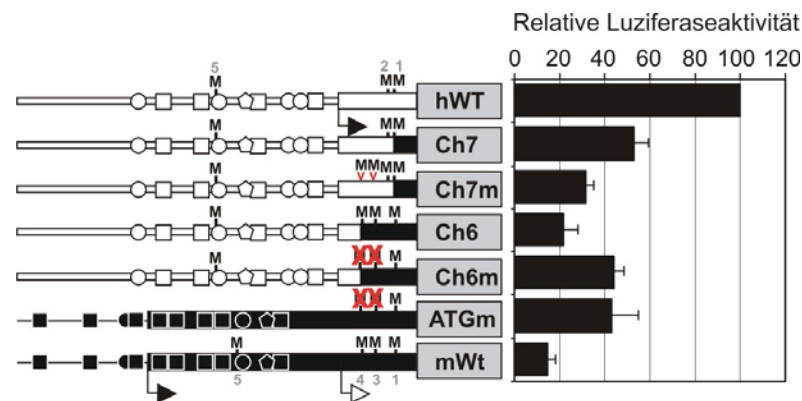


Abbildung 4-31. Effekte der *out-of-frame* ATGs in Mensch und Maus

Die chimären pGL3-*TLR4* Konstrukte +/- ATG3 und ATG4 wurden in RAW264.7 transient transfiziert. Zum Vergleich wurden ATG3 und ATG4 entweder im murinen Kontext mutiert oder in die humane Sequenz an der gleiche Stelle wie in der Maus eingebaut. Die Zusammensetzung der Promotoren aus Mensch (weiß) und Maus (schwarz) wurde schematisch dargestellt (siehe auch Abbildung 4-8) und ATGs (M) wie in Abbildung 4-30 nummeriert. Die Luciferasewerte + SD wurden mit Renilla-Luciferasewerten normalisiert und aus mindestens drei Experimenten gemittelt.

Die Mutation der ATGs 3 und 4 in den Reportergenkonstrukten ATGm und Ch6m führte im Vergleich zu den wildtypischen Konstrukten mWt und Ch6 zu einem 50%igen Rückgang der Reporteraktivität (Abbildung 4-31). Ein ähnlich starker Verlust wurde durch den Einbau der beiden ATGs im entsprechenden Abstand in den humanen *TLR4* Promotor nachgewiesen (Ch7 → Ch7m).

Die Daten deuten darauf hin, dass *upstream out-of-frame* ATGs an der Kontrolle der *TLR4* Expression Einfluss nehmen. Dieser Mechanismus könnte in der Maus dazu führen, dass trotz gleichbleibender Transkription die Spiegel an Tlr4 Protein niedrig bleiben.

4.6 TCR Mäuse: Ein humanisiertes TLR4 Mausmodell

Wie in den vorangegangenen *in vivo* Experimenten gezeigt werden konnte, ähnelt sich die Architektur des *TLR4* Promotors in Makrophagen von Mensch und Maus sehr. Allerdings wurden Hinweise auf unterschiedliche, möglicherweise posttranskriptionelle Mechanismen gefunden, die sich auf die Proteinexpression auswirken könnten. Die beiden Spezies unterscheiden sich außerdem in der *TLR4* Expression ihrer nicht-myeloischen Zellen.

Die Arbeitsgruppe von M. Freudenberg hat durch die Integration eines transgenen humanen *TLR4* Locus in eine *Tlr4*-defiziente Maus (C57BL/10ScCr) ein humanisiertes TLR4 Mausmodell entwickelt. Es wurde bereits von derselben

Arbeitsgruppe gezeigt, dass durch die Integration des murinen Wildtyp Transgens *Tlr4* die Empfindlichkeit der Mäuse gegenüber LPS wiederhergestellt werden konnte (Kalis, C. et al. 2003). Da eine stabile Transfektion meist mit dem Einbau von mehreren Kopien endet, wurden transgene Linien mit unterschiedlicher *Tlr4*-Kopienzahl erhalten. Diese zeigten interessanterweise eine starke Korrelation der Stärke der Immunantwort mit der Höhe der *Tlr4* Expression.

Bei der Transfektion eines BAC-Klons mit dem humanen *TLR4* Locus wurden ebenfalls transgene Linien mit unterschiedlicher Kopienzahl erzeugt. Zwei dieser humanisierten Mauslinien, TCR-6 und TCR-7, wurden uns zur Verfügung gestellt um diese im Vergleich zum Wildtyp auf ihre *TLR4* Expression in Makrophagen und den nicht-myeloischen, intestinalen Epithelzellen (IEC) zu untersuchen.

4.6.1 Untersuchung des *TLR4* Expressionsmusters

Zunächst wurde überprüft, ob in der transgenen Maus die gleichen *TLR4* Spleißvarianten wie im Menschen gebildet wurden. Dazu wurde die mRNA der Mauslinie TCR-7 (C57BL/10ScCr) mit dem Wildtyp Stamm C57BL/10ScSn verglichen (Abbildung 4-32).

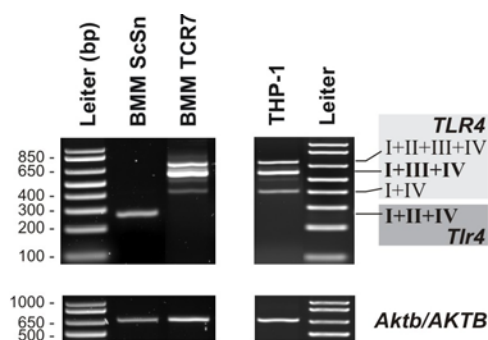


Abbildung 4-32. *TLR4* Spleißvarianten in den TCR Mäusen im Vergleich zu Mensch und Maus

Mit Hilfe geeigneter *TLR4* Primer wurden die mRNA Variationen in den BMM der TCR7 Mauslinie im Vergleich zum Wildtyp (BMM ScSn) und der humanen Zelllinie THP1 untersucht. Die verschiedenen Spleißformen (Zusammensetzung der Exons) sind erklärt und die *TLR4*-kodierenden Varianten fett gedruckt.

Wie erwartet, wurden in den BMM der TCR-7 Mauslinie, wie in der humanen Zelllinie THP1, die bereits beschriebenen Spleißvarianten (siehe Kapitel 4.1.1) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wird bei der Wildtyp Maus (ScSn) nur eine reife mRNA prozessiert.

In den vorherigen Experimenten wurden in Mensch und Maus abhängig vom Zelltyp unterschiedliche TSS gezeigt. Zur Kontrolle der spezifischen TSSs wurden 5'-RACE-PCR Analysen von Makrophagen und IEC der TCR-Mäuse durchgeführt.

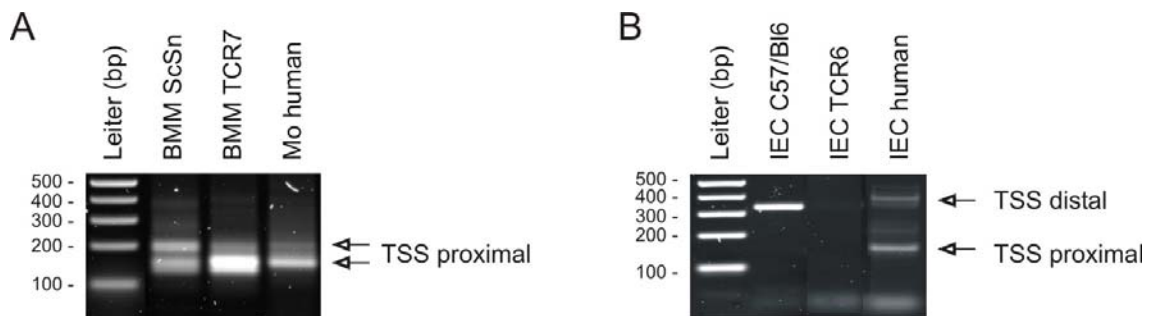


Abbildung 4-33. *TLR4* TSS-Analysen der myeloischen und nicht-myeloischen Zellen der TCR-Mäuse

A. Mittels 5'-RACE-PCR wurden die myeloischen TSSs der BMM aus der Wt (ScSn) und der humanisierten Maus (TCR) untersucht und die amplifizierten 5'-Enden sind im Vergleich zu humanen Monozyten abgebildet. B. Entsprechend wurden die nicht-myeloischen TSSs der IEC (Intestinal Epithelial Cells), die aus dem Darm isoliert wurden, bestimmt und im Vergleich zu den TSSs in humanen IEC dargestellt. Die Ergebnisse der Linie TCR6 in B und TCR7 in A sind jeweils repräsentativ für beide Linien. Die TSSs des distalen und proximalen Promotors sind mit Pfeilen markiert.

Abbildung 4-33 zeigt, dass alle Mausmakrophagen die Transkription am proximalen Promotor (~150 und ~200bp) initiieren, wobei in BMM der TCR-Maus im Einklang mit den untersuchten humanen Makrophagen der stromabwärtsliegende der beiden TSSs deutlich stärker benutzt wird. Die 5'-RACE-PCR Ergebnisse bestätigten die ausschließliche Benutzung des distalen Promotors in IEC der Wildtyp Mäuse C57Bl/6. Überraschenderweise konnten keine *TLR4* TSSs in den IEC der TCR-Mauslinien TCR-6 und TCR-7 detektiert werden. Dies deutete auf eine fehlende *TLR4* Expression in den Epithelzellen der transgenen Mäuse hin. Zum Vergleich wurden die TSSs von humanen primären IEC bestimmt. In Übereinstimmung mit der humanen Kolon-Karzinom Zelllinie HT29 (Abbildung 4-9) wurde der Hauptstart am proximalen Promotor und eine schwache Transkriptionsinitiation am distalen Promotor nachgewiesen.

4.6.2 Expressionsanalyse der myeloischen und nicht-myeloischen Zellen im Vergleich von Mensch und Maus

Die Experimente der PUER Zelllinie deutete auf eine erhöhte *Tlr4* Expression in Anwesenheit von PU.1 hin. Daraufhin wurden *TLR4* Spiegel von myeloischen und nicht-myeloischen Zellen untersucht.

Die Expressionsanalyse der *TLR4* mRNA von BMM und nicht-myeloischen IEC zeigte eine ca. 80-fach stärkere *Tlr4* Expression in Makrophagen im Vergleich zu den intestinalen Epithelzellen (Abbildung 4-34). Diese Tendenz war beim Menschen ähnlich, wobei in Monozyten im Vergleich zu IEC eine ca. 40-fache Expression detektiert wurde. In den IEC der transgenen Tiere war keine *TLR4* Expression nachweisbar, wie bereits aufgrund der negativen 5'-RACE-PCR Analyse vermutet wurde. Um die Menge an kontaminierenden myeloischen Zellen in den Epithelzellproben zu bestimmen, wurde die Expression von PU.1 als spezifischer Transkriptionsfaktor für Monozyten, Makrophagen und B-Zellen gemessen. In allen IEC Präparationen waren nur geringe Mengen an PU.1 mRNA detektierbar, was auf einen vernachlässigbar niedrigen Anteil myeloischer Zellen hindeutet.

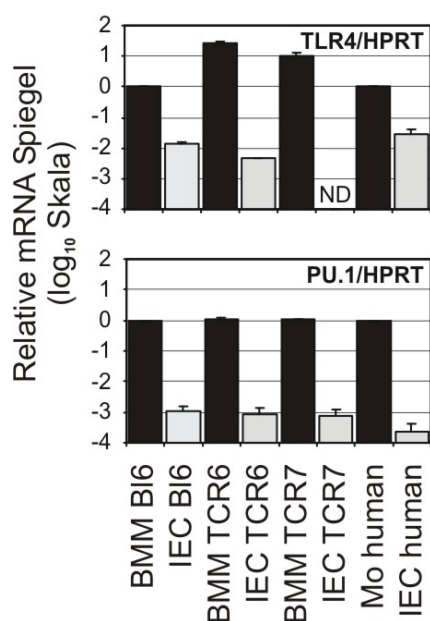


Abbildung 4-34. Quantitativer Vergleich der *TLR4* mRNA in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen

Real-time-PCR Analyse von umgeschriebener mRNA der BMM und IEC aus der Wt-Maus C57B/6 und den transgenen Linien TCR-6 und TCR-7. Zum Vergleich wurde der *TLR4*-Spiegel in humanen Monozyten (drei Proben) und IEC aus Patientenmaterial (sieben Proben) bestimmt. Die Messung von PU.1 diente zur Abschätzung der Kontamination der IEC Präparationen mit myeloischen Zellen. Die Lightcyclerwerte +SD wurden mit *HPRT* normalisiert und aus mindestens drei Experimenten berechnet. ND= nicht detektiert.

Aufgrund der minimalen *TLR4* Menge in den IEC Präparationen der transgenen TCR-Mauslinien wurden die 5'-RACE-Produkte nochmals mit einer höheren Zykluszahl (35 x) amplifiziert (Abbildung 4-35). In Epithelzellen der Linie TCR-7 konnte auch unter diesen Bedingungen kein Produkt detektiert werden (nicht gezeigt). Ein schwaches RACE-Produkt der TCR-6 Epithelzellen konnte dem TSS-Muster aus myeloischen Zellen zugeordnet werden (Abbildung 4-35). Wahrscheinlich ist die Herkunft der amplifizierten mRNA von den wenigen, kontaminierenden myeloischen Zellen in

der IEC Präparation. Die 2,7-fach stärkere *TLR4* Expression der TCR-6 Mauslinie lässt darauf schließen, dass das humane *TLR4* Gen in einer höheren Kopienzahl als in der TCR-7 Linie vorhanden ist.

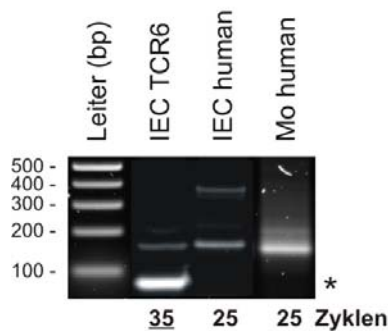


Abbildung 4-35. 5'-RACE-PCR mit erhöhter Zyklenzahl zum Nachweis von *TLR4*

Die RACE-PCR der IEC Probe aus der Linie TCR-6 wurde mit einer höheren Anzahl von Zyklen wiederholt, um auch kleinste Mengen an *TLR4* mRNA nachweisen zu können. Das Produkt, im Vergleich zu humanen IEC und Monozyten ist auf kontaminierende, myeloische Zellen (vgl. Mo human), als auf IEC (vgl. IEC human) zurückzuführen. * unspezifisches Produkt.

Die Expression des humanen *TLR4* in Makrophagen der transgenen TCR-Mäuse stimmte hinsichtlich der Transkriptionsstarts und des Spleißverhaltens mit dem Expressionsmuster des *TLR4* bei humanen Monozyten überein. Ursachen für die fehlende *TLR4* Expression in IEC der humanisierten Mäuse konnten jedoch nicht aufgeklärt werden.

4.7 Expressionsanalyse der *TLR5* mRNA bei Mensch und Maus

Eine unterschiedliche Expression in Mensch und Maus wurde auch für *TLR5*, der für die Erkennung von Bakterienflagellin von gram-positiven und gram-negativen Bakterien verantwortlich ist, beschrieben. In humanem Gewebe wurde eine ubiquitäre *TLR5* Expression nachgewiesen (Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. 2002), wobei zu den *TLR5* exprimierenden Zellen hauptsächlich intestinale Epithelzellen (IEC), dendritische Zellen (DC) und Monozyten gehören (Hayashi, F. et al. 2001, Maaser, C. et al. 2004). Im Gegensatz zu einer hohen mRNA Expression in der Lunge beim Menschen wurde ein sehr geringer *TLR5* Spiegel in der Maus und keine Expression in IEC, DCs und Makrophagen detektiert. Stattdessen exprimierten in der Maus hauptsächlich intestinale Lamina Propria Zellen (CD11c⁺) *TLR5* (Uematsu, S. et al. 2006).

Um herauszufinden, auf welcher Ebene die Spezies-spezifische Regulation von *TLR5* stattfindet, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die

Promotorsequenzen beider Spezies verglichen. Das Alignment in Abbildung 4-36 zeigt, dass sich die Promotoren in ihrer Sequenz tatsächlich voneinander unterscheiden. Aufgrund der Konservierung von einigen Sequenzabschnitten, vor allem im 3'-Bereich (gemeinsame GC-Boxen), kann jedoch von einem gemeinsamen Ursprung ausgegangen werden.

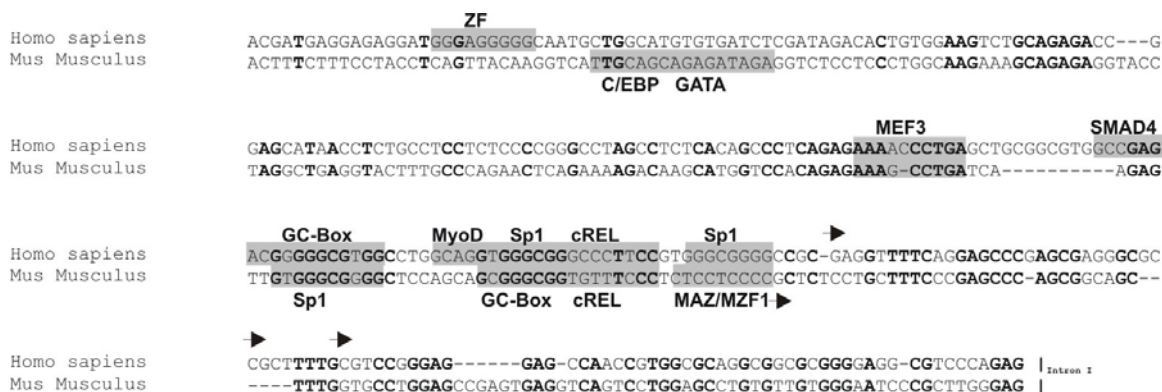


Abbildung 4-36. *TLR5* Promotor Alignment von Mensch und Maus

Sequenzvergleich des humanen und murinen *TLR5* Promotors. Konservierte Basen sind fettgedruckt und mögliche Binstellen für Transkriptionsfaktoren mit grauen Boxen hinterlegt. Schwarze Pfeile kennzeichnen die aus Datenbanken bekannten Transkriptionsstartpunkte.

Als nächstes wurde die *TLR5* Expression auf mRNA Ebene in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen von Mensch und Maus verglichen (Abbildung 4-37). Die humane *TLR5* Expression war sehr unterschiedlich bei den individuellen Zelltypen. Während in der monozytären THP1 Zelllinie kein *TLR5* nachweisbar war, exprimierten frisch isolierte Monozyten (Mo) relativ viel *TLR5*. Der Flagellin-Rezeptor wurde nach Adärenz (Mo 3 h) stark herunterreguliert und im Lauf der Differenzierung zu Makrophagen wieder stärker exprimiert (Mo 24 h). Nach Stimulation mit LPS konnte keine mRNA mehr detektiert werden. Die beiden Kolonkarzinom Epithelzelllinien unterschieden sich ebenfalls in ihrer Expression voneinander. CaCo Zellen exprimierten *TLR5* sehr deutlich, aber in den HT29 Zellen konnte *TLR5* mRNA kaum nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war mit Ausnahme der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 in allen murinen Zellen *Tlr5* mRNA detektierbar. Im deutlichen Widerspruch zur Literatur war die Expression in BMM am stärksten. Wie bei den humanen Monozyten wurde in der intestinalen Epithelzelllinie (mIC_{cl2}) das *Tlr5* Transkript nach LPS Stimulation stark herunterreguliert.

Ähnlich zum unterschiedlichen Spleißverhalten der *TLR4* mRNA (Abbildung 4-1) wurden beim Menschen im Vergleich zur Maus eine größere Anzahl an *TLR5* Spleißvarianten detektiert. Dieses Ergebnis weist auf eine Spezies-spezifische posttranskriptionelle Regulation des *TLR5* hin.

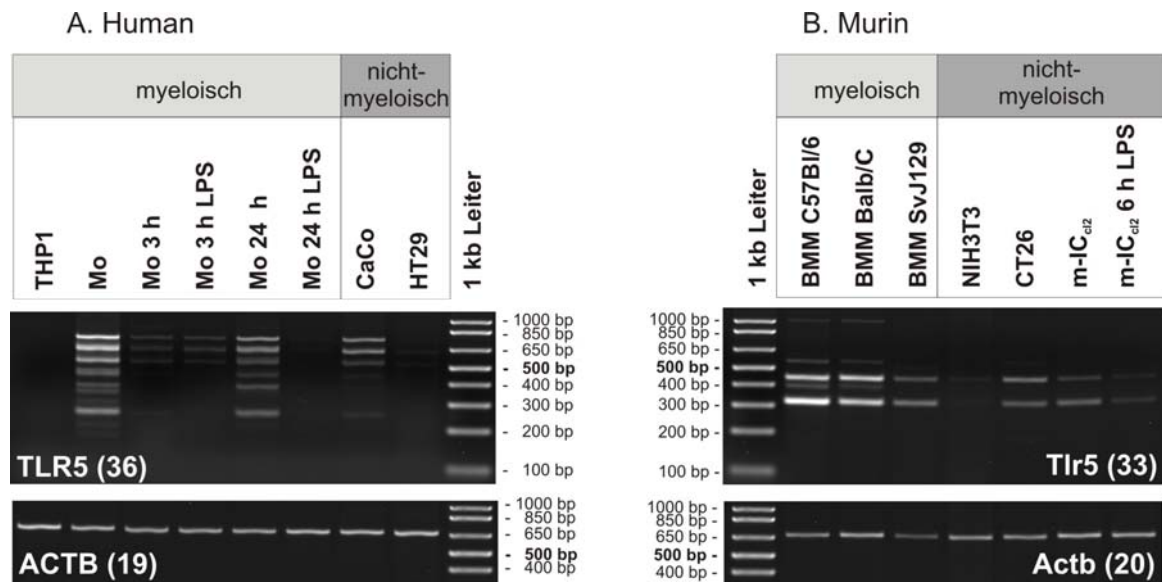


Abbildung 4-37. *TLR5* mRNA Expression in Mensch und Maus

RT-PCR Analysen mit Primern im ersten und letzten Exon zeigen die Expression und verschiedenen Spleißvarianten in primären Zellen und Zelllinien. A. Darstellung der humanen *TLR5* Transkripte in myeloischen (THP1 Monozyten, primäre Monozyten (Mo) während Adhärenz nach 3 h und 24 h \pm Stimulation mit LPS) und nicht-myeloischen Zellen (CaCo und HT29: Kolonkarzinom). B. Ergebnisse der RT-PCR Analyse der *Tlr5* Expression in murinen myeloischen BMM aus C57Bl/6, Balb/c und SvJ129 Mäusenstämmen) und nicht-myeloischen (NIH3T3 Fibroblasten, CT26 Kolonkarzinom und m-IC_{cl2} Darmepithelzellen \pm Stimulation mit LPS) Zellen. Die unterschiedliche Anzahl der PCR-Zyklen ist jeweils in Klammern angegeben und zur Ladungskontrolle wurde das Haushaltsgen *ACTB* (β -Aktin) amplifiziert.

4.8 Regulation des murinen *Tlr9* Promotors

Laut Literatur wird TLR9, der CpG-enthaltende DNA von Bakterien und Viren erkennt, in Mensch und Maus ebenfalls unterschiedlich reguliert. Während *TLR9* mRNA beim Menschen in plasmazytischen dendritischen Zellen und nicht auf myeloischen dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, wurde *TLR9* mRNA in der Maus in myeloischen dendritischen Zellen und auch Makrophagen nachgewiesen (Hemmi, H. et al. 2000, Krug, A. et al. 2001).

In Kooperation mit der australischen Arbeitsgruppe von D. Hume wurden fortführende Experimente zur Regulation des *Tlr9* Promotors in der Maus durchgeführt. Das Alignment der proximalen *TLR9* Promotorsequenzen zeigte

über große Abschnitte eine hohe Konservierung und viele gemeinsame regulatorische Elemente wie Ets-, E-Box-, Octamer- und AP1-Sequenzmotive (Abbildung 4-38).



Abbildung 4-38. Sequenz-Alignment der *TLR9* Promotoren von Mensch, Schimpanse, Hund und Maus

Konservierte Basen sind fettgedruckt und Bindestellen für Transkriptionsfaktoren über und unter den Sequenzen beschriftet und mit grauen Boxen hinterlegt. Konservierte Elemente sind Ets-Motive, E-Box-, Octamer- und AP1-Elemente und eine kombinierte IRF/Ets-Bindestelle. Eine TATA-Box ist nur bei Mensch und Schimpanse vorhanden. Die Pfeile markieren aus der Datenbank bekannte TSSs.

Während eine TATA-Box nur in den *TLR9* Promotoren der zueinander sehr nahe verwandten Spezies Mensch und Schimpanse vorhanden sind, wurde im murinen *Tlr9* Promotor ein kombiniertes IRF/Ets-Motiv identifiziert. Letzteres weist eine hohe Homologie zu dem IRF/Ets-Motiv im *TLR4* Promotor auf (Schroder, K. et al. 2007) bei dem in Mensch und Maus eine Bindung von ICSBP (IRF8) nachgewiesen werden konnte ((Rehli, M. et al. 2000), Abbildung 4-14). In einer EMSA-Analyse wurde zunächst eine mögliche Bindung von Icsbp an den murinen *Tlr9* Promotor untersucht. Im Gegensatz zum murinen *Tlr4* Promotor (Abbildung 4-15) war aber keine Icsbp Bindung an das IRF/Ets-Element im *Tlr9* Promotor nachweisbar.

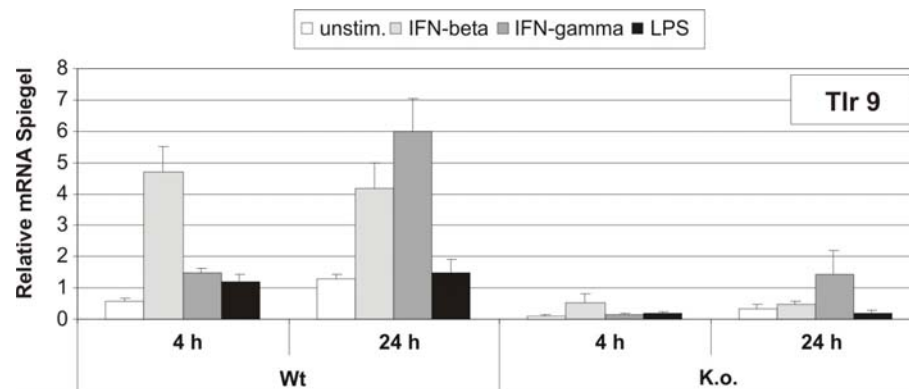


Abbildung 4-40. *Tlr9* mRNA Expression in Wildtyp und *lcsbp* K.o. Mäusen

BMM von Wildtyp (Wt) und *lcsbp* K.o. (K.o.) Mäusen wurden mit IFN-beta (100 U/ml), IFN-gamma (100 U/ml) und LPS (100 ng/ml) stimuliert und RNA zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert. Die *Tlr9* Spiegel wurden mit einer Real-time-PCR bestimmt und das Haushaltsgen *HPRT* diente zur Normalisierung. Die Lightcyclerwerte + SD stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der *lcsbp* K.o. Mäuse zeigten, dass *lcsbp* im Gegensatz zur Expression von *Tlr3* und *Tlr4* in der Regulation von *Tlr9* in Makrophagen eine entscheidende Rolle spielt.

5. Diskussion

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind eine unverzichtbare Komponente des angeborenen Immunsystems aller Wirbeltiere. Sie sind empfindliche Sensormoleküle, die potentiell pathogene Mikroorganismen früh detektieren können und Effektorzellen der angeborenen (Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile und Granulozyten) und der erworbenen (T- und B-Zellen) Immunabwehr aktivieren. Obwohl TLRs auf Proteinebene hochkonserviert sind, weisen verschiedene Studien auf eine unterschiedliche Regulation ihrer Gene in Mensch und Maus hin (Haehnel, V. et al. 2002, Heinz, S. et al. 2003, Rehli, M. 2002, Schroder, K. et al. 2007), was wiederum Auswirkungen auf die Funktion dieser wichtigen Rezeptoren in beiden Spezies haben könnte.

Das am Besten untersuchte Mitglied dieser Familie ist *TLR4*, dessen Genprodukt das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), einen Membranbestandteil gram-negativer Bakterien erkennt. Die Stärke der *TLR4*-abhängigen Immunantwort korreliert in transgenen Mäusen direkt mit der Höhe der *Tlr4* mRNA Expression (Bihl, F. et al. 2003, Kalis, C. et al. 2003, Roy, M. F. et al. 2006). Unterschiede auf der Ebene der Genregulation sind deshalb hinsichtlich der Spezies-spezifischen Immunantwort in Mensch und Maus äußerst interessant. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die *TLR4* Promotoren von Mensch und Maus trotz der hohen Konservierung ihrer Sequenz tatsächlich verschieden organisiert und sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell unterschiedlich reguliert sind.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur *TLR4* Expression in Makrophagen beider Spezies miteinander verglichen und anschließend die Regulation in myeloischen versus nicht-myeloischen Zellen diskutiert. Darüber hinaus werden erste Untersuchungen der Expression von *TLR5* in Mensch und Maus interpretiert und Ergebnisse zur Regulation von *TLR9* diskutiert werden.

5.1 *TLR4* Expression in humanen und murinen Makrophagen

Monozyten und Makrophagen sind die Hauptproduzenten des LPS-Rezeptors *TLR4*. Über die Regulation von *TLR4* in humanen Makrophagen ist bereits von

unserer Arbeitsgruppe publiziert worden, dass die Zelltyp-spezifische Expression von *TLR4* in Mensch und Maus von einem typisch myeloischen Promotor reguliert ist, der die klassischen Merkmale eines solchen Promotors aufweist (Rehli, M. et al. 2000). Dazu zählen die Abwesenheit einer TATA-Box und GC-reicher Sequenzen, sowie das Vorkommen mehrerer PU.1 Motive in der Nähe des Transkriptionsstarts.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Reporteranalysen für die *TLR4* Promotoren beider Spezies zeigten übereinstimmend mit der publizierten Studie einer anderen Arbeitsgruppe Spezies-spezifische Unterschiede bezüglich der Relevanz untersuchter *cis*-Elemente (Roger, T. et al. 2005). Um die volle Reporteraktivität in Makrophagen zu erreichen, waren im humanen *TLR4* Promotor wie bereits beschrieben zwei konservierte PU.1-Bindestellen und ein IRF-Motiv wichtig (Rehli, M. et al. 2000). Im Gegensatz dazu war im orthologen *Tlr4* Gen in der Maus die IRF-Bindestelle unwichtig und eine andere stromaufwärtsliegende PU.1-Bindestelle zeigte den größten Einfluss auf die Reporteraktivität. Dieses Ergebnis war aufgrund der stark konservierten Promotorsequenzen überraschend.

Mit der Durchführung von *in vivo* Experimenten wurden jedoch völlig neue Erkenntnisse über die *TLR4* Gen-Expression gewonnen. Die Ergebnisse der *in vivo* Footprints, ChIP Assays und TSS Analysen deuteten im Gegensatz zu den Reporteranalysen auf eine ähnliche Regulation der beiden Promotoren in myeloischen Zellen beider Spezies hin und zeigten, dass PU.1 mit konservierten Ets-Motiven beider Promotoren interagiert.

Zusätzlich wurde in beiden Spezies übereinstimmend die Bindung von Proteinen an die konservierte IRF-Bindestelle und an einer distalen Promotorsequenz nachgewiesen, die von anderen Arbeitsgruppen als AP1-Bindestelle beschrieben wurde (Roger, T. et al. 2005, Tsatsanis, C. et al. 2006). Die Bindung von AP1 an dieses Element konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde eine mit dem AP1-Motiv überlappende E-Box identifiziert, an die Transkriptionsfaktoren aus der Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteine binden können. Gelshifts und ChIP-Analysen lassen darauf schließen, dass in Mausmakrophagen Usf1 und Usf2 mit der E-Box interagieren, wobei die Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren nicht

ausgeschlossen werden kann. Mitglieder der USF-Familie sind dafür bekannt, dass sie mit Ets-Faktoren interagieren und dadurch gleichzeitig deren intramolekulare Inhibition zur DNA-Bindung aufheben (Tian, G. et al. 1999). Eine Protein-Protein-Interaktion der E-Box-bindenden Proteine mit Ets-Faktoren sind aufgrund benachbarter Ets-Motive vorstellbar.

Kreider et al. konnten in einer myeloischen Vorläuferzelllinie zeigen, dass E-Box-bindende Faktoren an der Differenzierung von myeloischen Zellen beteiligt sind (Kreider, B. L. et al. 1992). USF1 und USF2 binden als Homo- und Heterodimere an die DNA (Gregor, P. D. et al. 1990) und obwohl sie ubiquitär exprimiert werden, spielen sie bei der Expression gewebespezifischer Gene eine Rolle. Zum Beispiel werden die Gene für den Mannose-Rezeptor (*MRC*) und den Fc-Rezeptor (*FcγRIIIA*), die beide ausschließlich in myeloischen Zellen exprimiert werden, von USF-Faktoren reguliert. Dabei stellte sich PU.1 als weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die Promotoraktivität heraus (Egan, B. S. et al. 1999, Feinman, R. et al. 1994). Die Promotoren dieser Gene sind ähnlich zum *TLR4* Promotor TATA-los und Transkriptionsstarts (TSSs) wurden nahe der PU.1-Bindestelle nachgewiesen. Offensichtlich ist die Interaktion von USF mit PU.1 für die Bindung des initialen Transkriptionskomplexes an die DNA verantwortlich und aktiviert die Transkription typischer myeloischer Gene.

Zusammengefasst erscheint die basale Regulation der *TLR4* Genexpression in Makrophagen von Mensch und Maus sehr ähnlich kontrolliert und größtenteils von dem myeloischen Schlüsseltranskriptionsfaktor PU.1 abhängig zu sein.

Die Diskrepanz der zuvor beschriebenen Reporterstudien des murinen *Tlr4* Promotors und der *in vivo* Experimente in Makrophagen konnte insofern begründet werden, dass bei murinen Reporterkonstrukten nicht der in Makrophagen *in vivo* detektierte TSS verwendet wurde. Folglich sind Reporterassays für die Untersuchung des murinen *Tlr4* Promotors in Makrophagen ungeeignet und nicht interpretierbar. Die Ursache könnte in der transienten Transfektion liegen. Oft ist für die Aktivierung eines Gens eine Nukleosomenverschiebung entscheidend. Umgekehrt kann ein Nukleosom an der richtigen Stelle aber auch für die Nähe von zwei *cis*-Elementen sorgen und so zur Genaktivierung führen. Die Transkriptionsinitiation am murinen *Tlr4* Promotor in Makrophagen könnte daher durch die Chromatinstruktur reguliert sein. Ein

weiterer Grund könnten fehlende Enhancer sein, die oft weit vom Promotor entfernt in sogenannten „Locus-Control-Regions“ (LCR) liegen. Möglicherweise reicht deswegen der minimale Promotor in den Reporterkonstrukten nicht aus um eine makrophagentypische Transkription zu initiieren.

5.2 Spezies-spezifische Transkription der *TLR4* Gene in nicht-myeloischen Zellen

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den *TLR4* Promotoren von Mensch und Maus liegt jedoch in der unterschiedlichen Positionierung der TSSs in nicht-myeloischen Zellen. Zum ersten Mal wurde in dieser Arbeit ein alternativer, distaler Promotor in beiden *TLR4* Genen definiert. In murinen nicht-myeloischen Zellen erfolgt die Initiation der Transkription ausschließlich am distalen Promotor. Interessanterweise wird dieser in humanen Epithelzellen kaum verwendet, dafür aber hauptsächlich der in Makrophagen definierte proximale Promotor. *In vivo* Footprinting Analysen von murinen Fibroblasten- und Epithelzelllinien zeigten, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren auf den distalen Promotor beschränkt ist. Die AP1/E-Box, welche bHLH-Transkriptionsfaktoren bindet, wurde in Reporteranalysen als einflussreichstes Element in nicht-myeloischen Zellen identifiziert. Ähnlich wie bei Makrophagen dominierte bei *in vitro* Proteinbindungsexperimenten (EMSA) die Bindung von Homo- und Heterodimeren der USF-Faktoren (Usf1 und Usf2) an die E-Box in Fibroblasten. Im Gegensatz zu ChIP-Analysen in Makrophagen konnte in Fibroblasten jedoch keine USF-Bindung am *Tlr4* Promotor nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit spielten die USF-Faktoren in Koexpressionsstudien keine Rolle für die *Tlr4* Transkription. Weder USF-Expressionsplasmide noch dominant-negative Konstrukte hatten einen signifikanten Einfluss auf die *Tlr4* Promotor-vermittelte Reporteraktivität. Eine Diskrepanz zwischen verschiedenen experimentellen Ansätzen bezüglich Transkriptionsfaktor-Bindungen wurde schon früher beobachtet. So wurde bereits diskutiert, dass die selektive Bindung bestimmter E-Box-bindender Proteine möglicherweise von physiologischen Bedingungen *in vivo* abhängt, die in Zellkernextrakten, die für EMSAs verwendet werden, verloren gehen (Boyd, K. E. and Farnham, P. J. 1997). Im Falle des *Tlr4* E-Box-Elements

deuten also vor allem die *in vivo* nahen ChIP-Assays auf eine fehlende Usf-*Tlr4*-Promotor-Interaktion hin.

In den Koexpressionsexperimenten hatten dafür Faktoren der Mitf/TFE-Familie einen deutlichen Einfluss auf die Aktivierung des distalen Promotors. Die für Tfe3 und TFEB durchgeführten ChIP-Analysen waren nicht interpretierbar, da keiner der beiden Faktoren in ChIP Experimenten mit Kontrollgenen nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich sind die verwendeten Antikörper für diese Art von Experiment nicht geeignet.

Interessanterweise scheint der distale *TLR4* Promotor beim Menschen redundant zu sein. Obwohl der humane distale Promotor eine TATA-ähnliche Box aufweist, trägt er nur zum Teil zur mRNA Expression bei. Offensichtlich enthält die humane Promotorsequenz zusätzliche Elemente, die auch in nicht-myeloischen Zellen den Transkriptionsinitiationskomplex am proximalen Promotor stabilisieren. So führten Mutationen eines Initiator-ähnlichen (INR)-Elementes und einer nah am TSS liegenden CCAAT-Box (mögliche NF- κ B-Bindestelle) in humanen *TLR4* Promotorkonstrukten zu einem starken Verlust der Reporteraktivität, was auf eine Spezies-spezifische Rolle dieser Elemente hinweist.

Das INR-Element zeichnet sich durch eine Pyrimidin-reiche Sequenzumgebung des Start-Adenins (+1) aus und ist charakteristisch für eine Reihe von TATA-losen Promotoren (Schumacher, M. A. et al. 2003). Normalerweise bindet der Proteinkomplex TFII-D, der das TATA-bindende Protein (TBP) als zentrale Komponente neben TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) enthält, direkt an TATA-Box-Elemente. In Abwesenheit einer TATA-Box kann die Transkription auch durch das INR-Element initiiert werden. Hierbei wird TFII-D durch den Hilfsfaktor TFII-I, der mit der INR-Sequenz interagiert, an die richtige Position dirigiert (Roeder, R. G. 2005). Neben TFII-I wurde auch die Beteiligung von USF-Faktoren an der INR-Bindung beschrieben (Roy, A. L. et al. 1991, Roy, A. L. et al. 1993). Bisher konnten die Transkriptionsfaktoren, die an das INR-Motiv oder die CCAAT-Box binden, nicht identifiziert werden. Diese Elemente scheinen aber selbst in Abwesenheit von PU.1 eine stabilisierende Wirkung auf den Zusammenbau des Polymerasekomplexes zu haben.

Im Gegensatz dazu ist die *Tlr4* Transkription in murinen Makrophagen, in denen die oben genannten Elemente fehlen, ganz von PU.1 abhängig. In PU.1-defizienten Zellen vermitteln möglicherweise E-Box-bindende

Transkriptionsfaktoren in Kombination mit anderen Ets-Faktoren (z.B. Ets1, Elk1) das Andocken der Polymerase am distalen Promotor.

5.3 Einfluss von PU.1 und Icsbp auf die Regulation des *Tlr4* Promotors

Der Transkriptionsfaktor PU.1, der viele myeloische Gene wie Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. M-CSF; (Zhang, D. E. et al. 1994)) oder Adhäsionsmoleküle (z.B. CD11b; (Pahl, H. L. et al. 1992)) während der Zelldifferenzierung reguliert, stellte sich bereits als entscheidend für die Expression von *TLR4* im Menschen heraus. Ebenso wurde der myeloische und lymphatische IRF-Faktor ICSBP als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression des humanen *TLR4* beschrieben (Rehli, M. et al. 2000). Während eine starke Bindung von PU.1 *in vitro* und *in vivo* am murinen *Tlr4* Promotor detektiert wurde, war die Bindung von Icsbp nur *in vitro* nachweisbar. Im Folgenden wird die Rolle der beiden Transkriptionsfaktoren bei der Regulation des *Tlr4* Gens in der Maus diskutiert.

5.3.1 PU.1 und der Transkriptionsinitiationskomplex

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien über den *Tlr4* Promotor ließen vermuten, dass der Zelltyp-spezifische Transkriptionsfaktor PU.1 bei der Bildung und Lokalisation des Transkriptionskomplexes eine wesentliche Rolle spielt. Hagemeier et al. berichteten bereits, dass PU.1 *in vitro* eine Interaktion mit TFIID eingehen kann, wobei der N-terminale transaktivierende Teil von PU.1 direkt TBP bindet (Hagemeier, C. et al. 1993). Außerdem kann der Koaktivator CBP/p300 durch PU.1 an den Promotor rekrutiert werden (Yamamoto, H. et al. 1999). Dieser Komplex besitzt zum einen Histonacetylaseaktivität und ist andererseits ein Mittlerprotein zu Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes wie TFIID (Janknecht, R. and Hunter, T. 1996).

Mittels der murinen, PU.1-induzierbaren Progenitorzelllinie PUER konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass PU.1 in der Lage ist, die Transkriptionsmaschinerie an einen definierten Startpunkt zu dirigieren. Nach Aktivierung von PU.1 wurde innerhalb von 15 Minuten eine Verschiebung des TSS vom distalen Promotor zum proximalen Promotor festgestellt. Da der

Promotorwechsel ohne Verzögerung mit der Aktivierung von PU.1 erfolgte, scheint keine weitere Proteinsynthese nötig zu sein und PU.1 ist alleine für die Determinierung des TSS verantwortlich.

Es ist bekannt, dass PU.1 als Monomer an die DNA binden kann und dadurch eine leichte Biegung der DNA verursacht (Kodandapani, R. et al. 1996). Vermutlich vermittelt PU.1 direkt die Rekrutierung von TFII-D an die DNA und dadurch den ersten Schritt zum Aufbau des Transkriptionskomplexes. Dieser PU.1-abhängige Mechanismus ist besonders wichtig für die Expression von TATA- und INR-freien Genen in Makrophagen. Aktivierende Transkriptionsfaktoren, die an stromaufwärts gelegene regulatorische Elemente binden, tragen in der Regel über die Interaktion mit TAFs zur Stabilisierung der TFII-D Bindung bei (Fisher, R. C. and Scott, E. W. 1998). Bei der Expression des GM-CSF Rezeptor Gens (*CSF2RA*) führt die Bindung des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors C/EBP α zur Promotorstabilisierung und Erhöhung der Transkription (Hohaus, S. et al. 1995). In Enhancer-Regionen kann PU.1 auch unabhängig von seiner Aktivierungsdomäne über Protein-Protein-Interaktionen die lokale Chromatinstruktur verändern und dabei die Funktion eines Gerüstproteins bei der Formation des Transkriptionskomplexes übernehmen (Fisher, R. C. and Scott, E. W. 1998).

Erst kürzlich wurde in der gleichen PU.1-induzierbaren Progenitorzelllinie die PU.1-abhängige Expression des *Csf1r* Gens (*c-fms*, M-Csf Rezeptor) gezeigt (Krysinska, H. et al. 2007). Im Gegensatz zum *Tlr4* Promotor findet im Grundzustand keine Transkription des Gens statt. Erst nach Aktivierung bindet PU.1 als erster Transkriptionsfaktor an den *Csf1r* Promotor. Dadurch erfolgt eine Chromatinreorganisation, die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie C/EBP α/β und die Neusynthese eines Transkriptionsfaktors, der zusammen mit PU.1 an einen entfernt liegenden Enhancer bindet. PU.1 ist damit der Schlüsselfaktor für die Formation des Transkriptionskomplexes und die Zelltyp-spezifische Expression des M-Csf Rezeptors. Dabei kann PU.1 entweder direkt durch die Interaktion mit TFII-D oder indirekt als Stabilisatorprotein wirken.

Im Fall des *Tlr4* stabilisieren wahrscheinlich die E-Box-bindenden USF-Faktoren die Promotorarchitektur in Makrophagen. Möglicherweise ist auch ein noch unbekannter Enhancer an der korrekten *Tlr4* Expression in murinen Makrophagen beteiligt.

Obwohl Mensch und Maus proximale und distale *TLR4* Promotoren besitzen, hat sich die unterschiedliche Promotorverwendung in Abhängigkeit Zelltyp-spezifischer Transkriptionsfaktoren im Laufe der Evolution nur in der Maus entwickelt. Während in myeloischen Zellen der PU.1-abhängige proximale Promotor eine hohe Aktivität vermittelt, scheint der in nicht-myeloischen Zellen benutzte distale Promotor schwächer zu sein. Die Beteiligung ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktoren und möglicherweise anderer Zelltyp-spezifischer Transkriptionsfaktoren an der *Tlr4* Expression in nicht-myeloischen Zellen könnte eine Erklärung für das breite Vorkommen des *Tlr4* in verschiedenen Geweben der Maus sein.

5.3.2 *Icsbp* und der murine *Tlr4* Promotor

Um eine mögliche Beteiligung von *Icsbp* an der *Tlr4* Gen-Regulation in der Maus zu untersuchen, wurden Makrophagen von Wildtyp und *Icsbp*-defizienten Mäusen mit und ohne IFN- und LPS-Stimulierung verglichen. Im Gegensatz zu humanen Makrophagen ist *Icsbp* in murinen Makrophagen sehr schwach exprimiert, wird jedoch nach IFN γ -Stimulation stark induziert (Politis, A. D. et al. 1992), so dass *Icsbp* in Kooperation mit PU.1 möglicherweise für eine induzierte *Tlr4* Expression verantwortlich sein könnte. Jedoch wurde nur eine mäßige Induktion der *Tlr4* mRNA nach IFN γ -Stimulation detektiert. Des Weiteren scheint *Icsbp* nur geringfügig an der *Tlr4* Expression beteiligt zu sein, da *Icsbp*-defiziente Mäuse lediglich eine leicht verringerte basale *Tlr4* Expression zeigten. Die Regulation des *Tlr4* nach IFN α/β -Stimulierung war völlig unabhängig von *Icsbp*. Aufgrund einer Punktmutation in der IRF Konsensussequenz der kombinierten Ets/IRF-Bindestelle ist wahrscheinlich die Affinität zu *Icsbp* generell gering. In Übereinstimmung damit war nur eine sehr schwache *Icsbp*/PU.1/DNA-Komplexbildung im EMSA nachweisbar.

Der untersuchte Sequenzabschnitt könnte jedoch eine Rolle bei aktivierten, insbesondere LPS-stimulierten Makrophagen spielen. Erst kürzlich wurde in Genen, die während der Differenzierung von Makrophagen induziert werden, ein neues IRF/Ets-Element (IECS) identifiziert (siehe Kapitel 1.4.2 der Einleitung, (Tamura, T. et al. 2005)). Im Wesentlichen unterscheidet sich dieses von dem bisher beschriebenen IRF/Ets-Motiv (EICE) durch die umgekehrte Anordnung des

Ets-Motivs und der halben IRF-Bindestelle. Im murinen *Tlr4* Promotor überlagert sich dieses IECS-Motiv mit der bereits identifizierten EICE-Bindestelle im gemeinsamen Ets-Motiv, so dass eine putative IRF-Bindestelle (ISRE) entsteht. Dieses Sequenzmotiv wird von IRF-Dimeren erkannt und während IRF1 als Dimerisierungspartner aktivierend wirkt (Xiong, H. et al. 2003), wurden die IRF-Faktoren ICSBP, IRF4 und IRF2 auch in der negativen Genregulation beschrieben (Nelson, N. et al. 1993, Yamagata, T. et al. 1996, Yamamoto, H. et al. 1999).

Icsbp hatte keinen Einfluss auf die IFN- noch auf die LPS-vermittelte Regulation. Von dem myeloischen IRF-Faktor, Irf4 oder auch PIP genannt, ist jedoch bekannt, dass nach LPS-Stimulation innerhalb von zwei Stunden eine Translokation des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Kern erfolgt (Marecki, S. et al. 1999). Möglicherweise könnte nach einem LPS-Stimulus durch die Bindung von Irf4 an den murinen Promotor die *Tlr4* mRNA herunterreguliert werden. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des ubiquitär exprimierten Irf2 in der negativen *Tlr4* Regulation lieferte eine Studie, in der in Irf2-defizienten Mäusen nach einem LPS-Stimulus eine veränderte *Tlr4* Expression festgestellt wurde (Nhu, Q. M. et al. 2006). Ebenso wurde in der Literatur eine erhöhte mRNA-Instabilität als weiteren Mechanismus für den Rückgang des *Tlr4* Transkripts nach einer LPS-Stimulierung diskutiert (Fan, J. et al. 2002, Roger, T. et al. 2005).

Chimäre *TLR4* Reporterkonstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, weisen auf eine reprimierende Wirkung dieses Promotor-Elementes in der Maus im Gegensatz zum Menschen hin. Da die beschriebene Bindestelle im humanen Promotor nicht vorhanden ist, könnte das IECS-Motiv tatsächlich für eine negative Regulation im murinen Promotor nach einer LPS-Stimulierung verantwortlich sein.

5.4 Posttranskriptionelle Kontrolle der *TLR4* Regulation

Grundsätzlich gibt es neben der Promotor-gesteuerten Expressionskontrolle noch eine Reihe weiterer Mechanismen, welche die Expression eines Gens regulieren können. Dazu gehören unter anderem epigenetische Prozesse, Spleißverhalten und Stabilität der mRNA, translationale und posttranslationale Kontrollmechanismen. Die bei Reporteranalysen im Gegensatz zur

entsprechenden humanen Sequenz auffällig reprimierende Wirkung der 5'UTR des murinen *Tlr4* Gens war ein erster Hinweis auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation. Neben reprimierenden regulatorischen Promotorelementen in der 5'UTR, die nicht ausgeschlossen wurden, könnte ein Kontrollmechanismus auf der Ebene der Translation für die Aktivitätsunterschiede verantwortlich sein.

Im Allgemeinen ist die Translationseffizienz abhängig von *cis*-Elementen, welche die Translationsinitiation steuern. Dabei könnten z.B. Abweichungen von der sogenannten Kozaksequenz (5'-GCCA/GCC**ATGG**-3') die unterschiedliche Effizienz der *TLR4* Translation beider Spezies beeinflussen (Kozak, M. 1987b). Da die Region um das Startcodon zwischen Mensch und Maus stark konserviert ist, waren abhängig vom Translationsstartpunkt keine Unterschiede zu erwarten. Im murinen *Tlr4* Promotor konnten jedoch zwei nicht-konservierte *upstream* ATGs (uATG) identifiziert werden. Reporteranalysen zeigten, dass die Mutation beider uATGs in dem murinen Konstrukt zu einer Verdoppelung der Reporteraktivität führte. Zugleich wirkte sich die Insertion dieser uATGs in die entsprechende humane Sequenz in einem beträchtlichen Aktivitätsverlust des modifizierten humanen Konstruktes aus.

Solche uATGs und assoziierte *upstream open reading frames* (uORF) sind bekannte *cis*-Elemente, welche Gene auf der Ebene der Translation regulieren (Morris, D. R. and Geballe, A. P. 2000). Nur in ungefähr 10% der mRNAs von Eukaryoten wurden uATGs gefunden (Kozak, M. 1987a). Interessanterweise sind darunter viele Gene, die zentral an der Proliferation und Differenzierung der Zelle beteiligt und stark reguliert sind wie Zytokine und Rezeptorproteine. Besonders bei Proto-Onkogenen scheint dieser Kontrollmechanismus eine wichtige Rolle zu spielen, da zwei Drittel der Proto-Onkogene meist mehrere uATGs aufweisen (Kozak, M. 1991). Untersuchungen von mehreren uATG-enthaltenden Genen ergaben, dass die Translationseffizienz des kodierenden ORFs hauptsächlich vom Translationsende und der Reinitiation abhängt. Offensichtlich spielen dabei die Länge des vorherigen uORF und der intercistronische Abstand eine Rolle, da die Ribosomen nach Beendigung der Translation des uORF erst wieder mit allen Kofaktoren assoziieren müssen.

Allerdings sind nicht alle uATGs von einer optimalen Kozaksequenz umgeben, so dass einige Ribosomen diese überspringen und am eigentlichen Startcodon

initiiieren können. Dieser Prozess ist auch als „leaky scanning“ bekannt (Sachs, M. S. and Geballe, A. P. 2006) und wurde am *ERBB2* Proto-Onkogen (Her-2 Rezeptor) bereits gut untersucht. Aufgrund des geringen Abstands zwischen uORF und kodierendem ORF und wegen der starken Initiatorsequenz des uATGs wird *ERBB2* im Normalzustand sehr schwach exprimiert (Child, S. J. et al. 1999). Am Beispiel dieses Gens wurde ein weiterer Kontrollmechanismus beschrieben, bei dem 3'-UTR-Elemente die Translation von Genen mit uORF beeinflussen können. In Krebszellen die *ERBB2* überexprimieren wurde gezeigt, dass regulatorische Proteine an ein „Translational Derepression Element“ (TDE) in der 3'-UTR binden und für die verstärkte Ribosomenreinitiation am Startcodon und die erhöhte Translation des kodierenden ORFs sorgen (Mehta, A. et al. 2006).

Inwiefern die *Tlr4* Expression letztendlich von den vorhandenen uATGs beeinflusst wird und ob es dadurch Unterschiede zwischen den mRNAs des proximalen und distalen Promotors gibt, muss weiter untersucht werden. Eine durch die uATGs verringerte *Tlr4* Translation in der Maus könnte bei vergleichbarer mRNA Transkription in beiden Spezies durchaus eine Erklärung für die höhere LPS-Toleranz der Maus gegenüber dem Menschen sein.

Neben Proto-Onkogenen wurde die Regulation durch uATGs auch für die Expression wichtiger Gene der Immunantwort, z.B. für IL-12 und den Komplementfaktor B, beschrieben (Babik, J. M. et al. 1999, Garnier, G. et al. 1995). Interessanterweise erfolgt bei diesen normalerweise schwach exprimierten Genen während eines Entzündungsprozesses eine Verschiebung des TSS, so dass inhibierende ATGs umgangen werden. Die Hochregulation der Proteinexpression dieser Gene ist das Ergebnis verstärkter Transkription und Translation. Durch die Kontrolle auf Ebene der Translation schützt sich die Zelle generell vor der Überproduktion von selbstschädlichen Proteinen. Gleichzeitig bleibt jedoch der Genloкус offen und Transkriptionsfaktoren stehen für eine schnelle Induktion der Expression z.B. nach einer Stimulierung bereit.

Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse aller humanen und murinen TLR Promotoren zeigte das Vorkommen von uATGs in 80% der Fälle. TLRs unterliegen einer sehr strengen Kontrolle, da sie die einflussreichsten Komponenten des Immunsystems darstellen. Dabei müssen sie im Grundzustand eine gewisse Toleranz gegenüber nicht-pathogenen und möglichen körpereigenen

Agonisten zeigen (Pasare, C. and Medzhitov, R. 2003), aber dennoch schädliche Eindringlinge sofort erkennen und mit einer spezifischen Immunantwort reagieren. Die translationale Kontrolle durch uATGs könnte einen konservierten Mechanismus nicht nur für die aktivierungsabhängige, sondern auch für die Zelltyp-spezifische Expression dieser wichtigen Immunrezeptoren darstellen.

5.5 TLR4 in epithelialen Zellen

Als physikalische Barriere zählen Epithelzellen zu den Effektorzellen der angeborenen Immunantwort und dienen der Abwehr von invasiven pathogenen Mikroorganismen. Vor allem im Verdauungstrakt sind sie von kommensalen Bakterien besiedelt und dadurch ständig TLR-aktivierenden Komponenten ausgesetzt, rufen aber normalerweise keine Entzündungsreaktion hervor. Lange Zeit nahm man an, dass Epithelzellen keine TLRs und/oder Korezeptoren wie CD14 und MD-2 exprimieren. Neuere Arbeiten widerlegen dies (Backhed, F. and Hornef, M. 2003) und es konnte sogar gezeigt werden, dass die Interaktion der TLRs mit kommensalen Bakterien zur Erhaltung der intestinalen epithelialen Homeostase wichtig ist (Rakoff-Nahoum, S. et al. 2004). Untersuchungen von hauptsächlich intestinalen Epithelzellen (IEC) zeigten verschiedene Mechanismen die zur Toleranz des TLR4 gegenüber LPS führen wie intrazelluläre Lokalisation, schwache Expression des Rezeptors oder fehlende Korezeptoren (siehe Kapitel 1.3.1 der Einleitung).

Chronische Entzündungskrankheiten, wie z.B. Morbus Crohn und Ulzerative Colitis, sind jedoch durch eine TLR4 Hochregulation in intestinalen Makrophagen und IEC charakterisiert, wodurch es zu einem starken Entzündungsprozess und irreparablen Gewebsschädigung kommt (Cario, E. et al. 2000, Hausmann, M. et al. 2002). Die Untersuchung der *TLR4* Regulation in Epithelzellen könnte deshalb unser Verständnis der Entstehungsprozesse solcher Krankheiten verbessern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beim Vergleich des humanen und murinen *TLR4* Gens besonders bei Epithelzellen Unterschiede in der Transkriptionsregulation festgestellt. An dieser Stelle muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die mRNA Expression noch keine Aussage über einen funktionellen Immunrezeptor zulässt. Dazu sind Studien zur Lokalisation und Überprüfung des Vorhandenseins der essentiellen Kofaktoren nötig. Jedoch können mRNA Analysen dazu

beitragen, die komplexe Funktion dieser Zelltypen hinsichtlich der Immunreaktion besser zu verstehen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die basalen *TLR4* mRNA Spiegel in intestinalen Epithelzellen von Mensch und Maus im Verhältnis zu myeloischen Zellen ähnlich sind. Spezies-spezifische Unterschiede wurden jedoch nach Zellaktivierung festgestellt. Übereinstimmend mit der bekannten Literatur wurde in einer humanen Epithelzelllinie eine Induktion von *TLR4* nach Stimulierung mit den T_H1 -Zytokinen $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$, aber eine Reduktion nach IL-4-Stimulierung, einem T_H2 -Zytokin, nachgewiesen (Abreu, M. T. et al. 2002, Mueller, T. et al. 2006). Dagegen wurde keine Zytokin-induzierte Regulation in der epithelialen Mauszelllinie detektiert. Eine *Tlr4*-Induktion wurde lediglich detektiert, wenn diese mit $IFN\gamma$ vorstimuliert und dann mit LPS stimuliert wurden. Es ist bekannt, dass *TLR4* durch die Vernetzung der Signalwege von $IFN\gamma$ und LPS induziert und die LPS-abhängige Herunterregulation des *TLR4* unterdrückt wird (Schroder, K. et al. 2004, Schroder, K. et al. 2006). Interessanterweise wurde in $IFN\gamma$ -vorbehandelten humanen Epithelzellen der Induktionseffekt durch die nachträgliche Stimulation mit LPS zum Teil wieder aufgehoben. Diese Daten deuten darauf hin, dass in der Maus durch den Promotorwechsel möglicherweise eine Zelltyp-spezifische Induzierbarkeit der *Tlr4* Expression erreicht wird.

Diese und viele publizierte Studien wurden in Zelllinien durchgeführt (Abreu, M. T. et al. 2002, Mueller, T. et al. 2006, Otte, J. M. et al. 2004), wobei die Ergebnisse oft aufgrund laborabhängiger Zellkulturbedingungen und unterschiedlicher Zellpassagen abweichend oder sogar gegenteilig sein können. Ausserdem können sich Zelllinien aufgrund ihres Tumor-Ursprungs in ihrem Verhalten von Primärzellen deutlich unterscheiden. Eine humanisierte *TLR4* Maus, die im Labor von M. Freudenberg (MPI Freiburg) generiert wurde, defizient für den murinen *Tlr4* Locus ist und dafür mehrere humane *TLR4* Genkopien enthält, hätte einen direkteren Vergleich der Regulation des humanen und murinen *TLR4* unter gleichen Bedingungen ermöglichen können. Besonders vergleichende Untersuchungen an intestinalen Epithelzellen könnten davon profitieren, da die Gewinnung von gesunden humanen Zellen schwierig ist.

Die Charakterisierung der Makrophagen der rekombinanten Maus zeigte zwar wie erwartet das gleiche mRNA Expressionsmuster und die gleichen TSSs wie

humane Makrophagen, jedoch konnte selbst mit der sehr sensitiven Real-time-PCR keine *TLR4* Expression in den human-transgenen IEC detektiert werden. Warum die transgenen Mäuse in IEC kein *TLR4* exprimieren ist unklar. Einerseits könnten dem transduzierten humanen *TLR4* BAC-Klon wichtige regulatorische Elemente fehlen, die in einem weiter entfernten Enhancer liegen und nur für die Expression in nicht-myeloischen Zellen wichtig sind. Eine weitere Möglichkeit sind Spezies-spezifische Unterschiede in den Transkriptionsfaktoren, die entweder in den murinen Epithelzellen nicht exprimiert sind oder zu große Abweichungen zum orthologen Transkriptionsfaktor aufweisen. Außerdem konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die *TLR4* Expression in humanen Epithelzellen im Normalzustand tatsächlich unter der Nachweisgrenze liegt. Alle analysierten humanen Epithelzellproben stammen aus Darmbiopsien, die zwar befundlos gewertet wurden, aber durch die Nähe zu erkranktem Gewebe bereits dereguliert oder stimuliert gewesen sein könnten.

Eine Möglichkeit das Fehlen eines Enhancers und wichtigen Transkriptionsfaktoren auszuschließen, wäre die Kultivierung und anschließende Stimulierung der transgenen intestinalen Epithelzellen mit den proinflammatorischen Zytokinen $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, die bereits eine *TLR4* Hochregulation in humanen epithelialen Zelllinien hervorriefen ((Abreu, M. T. et al. 2002, Mueller, T. et al. 2006) und in dieser Arbeit). Ein *in vivo* Modell zur Feststellung einer möglichen human-transgenen *TLR4* Expression nach Aktivierung wäre die orale Verabreichung verschiedener LPS-Dosierungen an die Mäuse oder die bereits beschriebene Induktion einer Colitis durch die Verabreichung von DSS (Dextran Sulfate Sodium) (Rakoff-Nahoum, S. et al. 2004). Wenn tatsächlich eine *TLR4* Induktion in den Darmepithelzellen der transgenen Mäuse gezeigt werden kann, wäre dies ein erster Hinweis für die fehlende *TLR4* Expression in gesundem humanem Gewebe.

Andere Arbeitsgruppen sind sich über die *TLR4* mRNA Expression in humanen epithelialen Darmzellen einig und haben geringe, aber deutlich messbare *TLR4* Spiegel in der Literatur beschrieben (Abreu, M. T. et al. 2002, Hausmann, M. et al. 2002, Otte, J. M. et al. 2004). Im Gegensatz dazu exprimierten intestinale Makrophagen im Menschen keine *TLR4* mRNA, aber die *TLR4* Expression wurde während des Entzündungsprozesses induziert (Hausmann, M. et al. 2002). Die Ergebnisse der unstimulierten und damit LPS-insensitiven Makrophagen aus den

Biopsien von pathologisch gesundem Gewebe deuten generell auf keine Vorstimulation hin. Für mononukleäre Lamina Propria Zellen wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, dass diese spezifisch für eine Entzündung hohe Mengen an *IL-1 β* mRNA exprimieren (Hausmann, M. et al. 2002). Möglicherweise könnten solche Entzündungsmarker ebenfalls für intestinale Epithelzellen etabliert werden um einen direkten Nachweis für den unstimulierten Zustand der untersuchten Zellen zu erhalten.

5.6 Zusammenfassung der Regulationsmechanismen von *TLR4* in Maus und Mensch

Das in den obigen Unterkapiteln diskutierte derzeitige Verständnis der Regulation des *TLR4* Promotors in Maus und Mensch ist in der Übersichtsdarstellung in Abbildung 5-1 zusammengefasst. Der wesentlichste Unterschied liegt in der strikt getrennten Verwendung der TSSs bei der Maus. Während in myeloischen Zellen (BMM) der initiale Transkriptionskomplex durch die dominierende Bindung von PU.1 an den *Tlr4* Promotor dirigiert wird, erfolgt die Transkription in nicht-myeloischen Zellen wie Fibroblasten und intestinalen Epithelzellen ausschließlich am distalen Promotor. Dabei sind abhängig vom Zelltyp unterschiedliche E-Box-bindende Faktoren (bHLH) beteiligt. In Makrophagen scheinen USF-Faktoren den Promotor zu stabilisieren, dagegen sind in nicht-myeloischen Zellen in Abwesenheit von PU.1 Mitglieder der Mitf/TFE-Familie hauptsächlich an der Transkriptionsinitiation beteiligt.

Im Gegensatz dazu wird beim Menschen in beiden Zelltypen der proximale Promotor verwendet. In Makrophagen sind die gleichen, konservierten regulatorischen Elemente (PU.1_1, 2 und 5; IRF/Ets; AP1/E-Box) wie in der Maus besetzt. Der distale Promotor wird in intestinalen Epithelzellen nur zum Teil verwendet und weitere DNA-Motive, z.B. ein Initiator-Element, stabilisieren vermutlich den proximalen Promotor selbst in Abwesenheit von PU.1.

Ein weiterer Kontrollmechanismus wurde für das murine *Tlr4* Gen nachgewiesen. Zwei nicht-konservierte *upstream* ATGs im *Tlr4* Promotor beeinflussen offensichtlich die Translation und führen im Gegensatz zum Menschen zu einer geringeren *Tlr4* Expression durch die posttranskriptionelle Kontrolle.

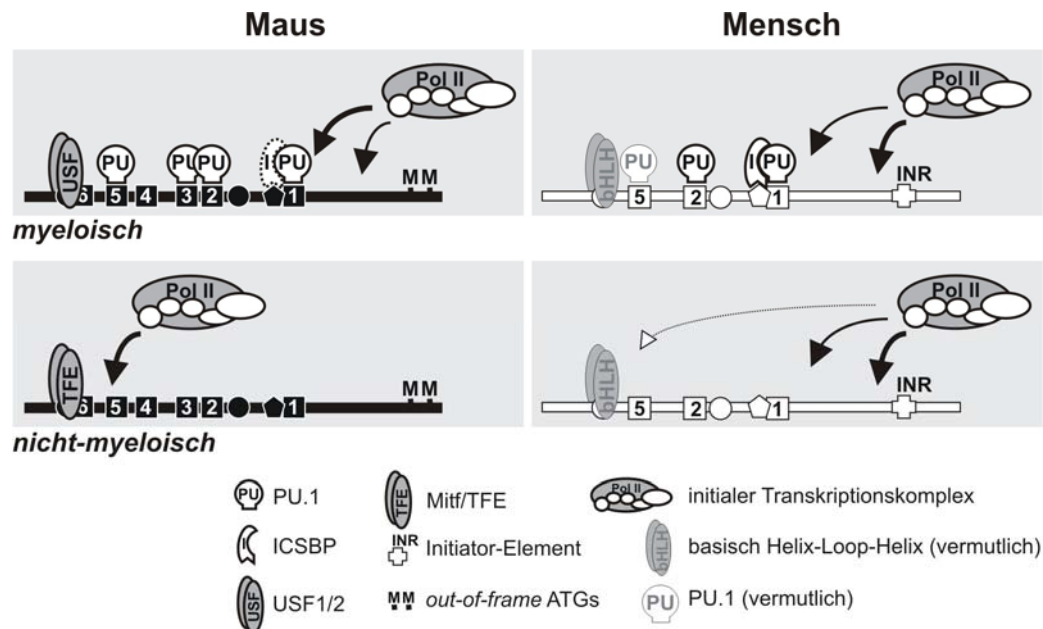


Abbildung 5-1. Regulation des *TLR4* in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen von Maus und Mensch

Die Ereignisse bei der Transkription von *TLR4* sind für die unterschiedlichen Zelltypen in Maus und Mensch schematisch dargestellt. Die Besetzung mit Transkriptionsfaktoren für BMM/Monozyten sowie Fibroblasten und intestinale Epithelzellen sind, so weit bekannt, illustriert. Die Rekrutierung des Pol II-Komplexes und verwendete Startpunkte sind durch unterschiedliche Pfeilstärken gekennzeichnet. Die Symbole sind in der Legende beschriftet.

5.7 Regulation des *TLR5* Gens in Maus und Mensch

Für zwei weitere TLR Gene, *TLR5* und *TLR9*, wurden in der Literatur bereits Unterschiede in der Expression zwischen Mensch und Maus beschrieben. *TLR5* erkennt bakterielles Flagellin und beim Menschen wurde seine Expression in Monozyten, dendritischen Zellen und Epithelzellen nachgewiesen (Muzio, M. et al. 2000). Dagegen wurde gezeigt, dass die Expression von *Tlr5* in der Maus hauptsächlich auf Epithelzellen beschränkt und in Makrophagen oder myeloischen dendritischen Zellen nicht nachweisbar ist (Means, T. K. et al. 2003, Uematsu, S. et al. 2006).

Unterschiede in den Promotoren beider Spezies könnten auch bei den *TLR5* Genen ursächlich für die beobachteten Expressionsmuster sein. Analysen der mRNA Expression der verschiedenen Zelltypen (Monozyten, Makrophagen und

epitheliale Zellen) die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten jedoch in beiden Spezies eine deutliche *TLR5* Expression in diesen Zelltypen. Möglicherweise sind die Unterschiede darauf zurückzuführen, dass andere Arbeitsgruppen peritoneale Makrophagen und in dieser Arbeit BMM analysiert wurden. Andererseits wurde erst kürzlich eine *TLR5* Expression auch in konventionellen dendritischen Zellen der Maus beschrieben (Uchida, T. et al. 2007).

Unterschiedliche regulatorische Elemente könnten sich aber auch in diesem Fall auf die gewebespezifische Expression von *TLR5* und die Transkriptionseffizienz auswirken. In ersten Reporteranalysen wurde in Makrophagen eine deutlich höhere Aktivität des humanen gegenüber dem murinen Konstrukt gemessen. Des weiteren wurde beim humanen *TLR5* Gen eine größere Anzahl von Spleißvarianten detektiert, die auf eine unterschiedliche posttranskriptionelle Regulation der beiden *TLR5* Gene hinweisen könnten. Da die in der Literatur postulierten, eindeutigen Spezies-Unterschiede nicht bestätigt werden konnten, wurde aus Zeitgründen von einer weiteren Analyse der *TLR5* Gene abgesehen. Weitere funktionelle Analysen könnten aber auch hier interessante und potentiell relevante Spezies-spezifische Regulationsmechanismen aufdecken.

5.8 Regulation des *TLR9* Gens in Maus und Mensch

Im Gegensatz zu *TLR5* sind die *TLR9* Gen-Promotoren verschiedener Spezies größtenteils konserviert und weisen ähnliche regulatorische Elemente wie der *TLR4* Promotor (Ets, Ets/IRF, AP1 und E-Box) auf. Trotzdem deutet die Expression von *TLR9*, der CpG-reiche DNA erkennt, in Mensch und Maus auf regulatorische Unterschiede hin. Während beim Menschen *TLR9* hauptsächlich in plasmazytischen dendritischen Zellen, aber auch in B-Zellen exprimiert wird, wurde *Tlr9* bei der Maus sowohl in Makrophagen, myeloischen dendritischen Zellen und B-Zellen nachgewiesen (Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2004).

Eine Arbeit über die Regulation des humanen *TLR9* Promotors in B-Zellen zeigte die Notwendigkeit von Ets-, C/EBP- und CRE-Elementen für die *TLR9* Expression (Takeshita, F. et al. 2004). Neuere Untersuchungen zum murinen *Tlr9* in Makrophagen zeigten, dass wahrscheinlich Spezies-spezifische und Zelltyp-spezifische Elemente zu der unterschiedlichen Regulation führen. In Reporteranalysen war ein nur minimaler 100 bp- *Tlr9* Promotor einschließlich

einer essentiellen IRF/Ets-Bindestelle (EICE) für die basale und IFN γ -induzierte Reporteraktivität ausreichend, wobei lediglich die Bindung von PU.1 an das Ets-Motiv gezeigt werden konnte (Schroder, K. et al. 2007). Da im murinen *Tlr9* Promotor keine TATA-Box vorhanden ist, erfolgt die Transkription vermutlich ähnlich wie beim *Tlr4* Promotor und PU.1 ist wahrscheinlich der Ansatzpunkt für die Bildung des Transkriptionskomplexes (siehe Kapitel 5.3.1 der Diskussion). Von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde außerdem der Transkriptionsfaktor AP1 für die konstitutive *Tlr9* Expression verantwortlich gemacht (Guo, Z. et al. 2005). Die Bindung von AP1 an den murinen Tlr9 wurde bestätigt (Schroder, K. et al. 2007) und trägt vermutlich zur Stabilisierung des Pol II-Komplexes bei.

Das IRF/Ets-Motiv im murinen *Tlr9* Promotor entspricht bis auf eine Punktmutation dem IRF/Ets-Motiv im humanen *TLR4*, für das eine Bindung von ICSBP bereits gezeigt wurde (Rehli, M. et al. 2000). Für ein Kooperationsprojekt mit K. Schroder (Arbeitsgruppe D. Hume) wurde im Rahmen dieser Arbeit die konstitutive sowie die IFN- und LPS-induzierte *Tlr9* Expression in *Icsbp*-defizienten Mäusen untersucht. Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass der IRF-Faktor *Icsbp* ein wichtiger Koregulator der konstitutiven und frühen IFN γ -induzierten Expression ist. *Icsbp* ist in B-Zellen und Makrophagen exprimiert, wird durch IFN γ stark induziert (Marecki, S. et al. 1999) und bindet vermutlich zusammen mit PU.1 an das IRF/Ets-Motiv. In Übereinstimmung damit zeigten Expressionsanalysen die parallel verlaufende Hochregulation von *Icsbp* und *Tlr9* nach IFN γ -Stimulierung (Schroder, K. et al. 2007). Trotz der eindeutigen Abhängigkeit der *Tlr9* Regulation von *Icsbp* konnte jedoch keine Bindung dieses Faktors an die murine *Tlr9* IRF/Ets-Bindestelle nachgewiesen werden (in dieser Arbeit und von K. Schroder).

Möglicherweise ist aufgrund einer Punktmutation des ansonsten konservierten IRF/Ets-Motivs die DNA-Bindung von *Icsbp* sehr schwach und der *Icsbp*/PU.1/DNA-Komplex war unter den verwendeten EMSA-Bedingungen nicht stabil. Erst kürzlich wurde ein weiteres untypisches IRF/Ets-Motiv (IECS) ungefähr 130 bp stromaufwärts der bisher untersuchten IRF/Ets-Bindestelle (EICE) identifiziert, das zwischen Mensch und Maus konserviert ist. Diese Bindestelle war in den oben beschriebenen 100 bp-Reporterkonstrukten nicht enthalten und auch weitere bis zu 2 kb- *Tlr9* Promotorkonstrukte zeigten keine stärkere Aktivierung. Eine Funktion dieses IRF/Ets-Motivs für die *TLR9* Expression *in vivo* kann aber

ohne eine funktionelle Analyse nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise bindet Icsbp an einen weit entfernt liegenden Enhancer der für die Chromatinreorganisation und effiziente Transkription nötig ist, wie z.B. beim *Csf1r* Gen (Krysinska, H. et al. 2007) und könnte die fehlende *Tlr9* Expression erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre ein indirekter Kontrollmechanismus, so dass keine Icsbp-*Tlr9*-Promotor-Interaktion zustandekommt. Der IRF-Faktor könnte z.B. andere Proteine regulieren, die wiederum die *Tlr9* Expression beeinflussen. Zusammengefasst ist Icsbp ein unersetzbarer Transkriptionsfaktor für die basale Expression, wobei der genaue Wirkmechanismus noch unklar ist.

Die IFN β -induzierte Hochregulation scheint weitgehend unabhängig von Icsbp zu verlaufen. Von einer anderen Arbeit ist bekannt, dass zwei weitere ca. 2,4 kb stromaufwärts liegende IRF-Motive (ISRE) für diese Regulation verantwortlich sind. Während diese stromaufwärts liegenden Elemente im Grundzustand von dem negativen Regulator IRF2 gebunden sind, interagieren sie im aktivierten Zustand vermutlich mit den Transkriptionsfaktoren IRF1 und ISGF3, einem Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9 (Guo, Z. et al. 2005). Die Induktion der *Tlr9* mRNA in den Icsbp-defizienten Makrophagen zu späteren Zeitpunkten nach IFN γ -Stimulierung war überraschend. Hierfür könnte autokrin über IFN γ -induziertes IFN β verantwortlich sein (Schroder, K. et al. 2007).

Während die IFN γ -induzierte *Tlr9* Expression direkt über die Hochregulation von Icsbp vermittelt wird, verläuft die *Tlr9* Induktion nach LPS-Stimulation indirekt, durch die Herunterregulation des M-Csf Rezeptors (Sester, D. P. et al. 2005). Damit übereinstimmend konnte in dem Kollaborationsprojekt von K. Schroder gezeigt werden, dass die *Tlr9* mRNA Expression in Anwesenheit von M-Csf herunterreguliert wird. Nach LPS-Stimulierung kommt es zu einer Aufhebung dieser Repression und dadurch zur indirekten Induktion von *Tlr9* (Schroder, K. et al. 2007).

Die unabhängigen Wege der *TLR9* Induktion nach Stimulation mit IFN γ oder LPS können auf die Zelle eine synergistische Wirkung haben. Während einer Infektion erkennen Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr CpG-reiche DNA und zugleich bakterielle Produkte wie LPS und proinflammatorische Zytokine wie IFN γ . LPS und IFN γ potenzieren bekannterweise die CpG-DNA-vermittelte Immunantwort (Hemmi, H. et al. 2000, Sweet, M. J. et al. 1998). Damit übereinstimmend zeigten Mäuse mit einem Defekt in der IFN γ -Signaltransduktion

eine beeinträchtigte Antwort nach Stimulierung mit CpG-reicher DNA (Van Uden, J. H. et al. 2001). Dieser kooperative Mechanismus ist insofern physiologisch relevant, weil durch die Stimulation des TLR9 B-Zellen zur Proliferation und Produktion von „T_H1 Immunglobulinen“ (hauptsächlich IgM) angeregt werden und plasmazytische dendritische Zellen, welche typischerweise T_H1-Zytokine wie IFN, IL-12 und TNF α ausschütten, aktiviert werden (Wagner, H. 2002, Yi, A. K. et al. 1996).

Die Arbeiten zur *Tlr9* Regulation in der Maus zeigen, dass die basale und IFN γ -induzierte Expression von dem myeloischen Transkriptionsfaktor Icsbp abhängt. Darüberhinaus stellt dieses Gen ein weiteres Beispiel für Spezies-spezifische Kontrollmechanismen in dieser für die Immunität wichtigen Rezeptorfamilie dar.

6. Ausblick

Die Charakterisierung der proximalen Promotoren von TLRs zeigte bereits deutliche Unterschiede zwischen Mensch und Maus. Vor allem die deutlichen Unterschiede der *TLR4* Expression in den myeloischen und nicht-myeloischen Zellen sollten weiter untersucht werden. Dabei spielen E-Box-bindende Faktoren offensichtlich eine große Rolle. Die Identifizierung weiterer Transkriptionsfaktoren, die an der *TLR4* Expression in nicht-myeloischen Zellen beteiligt sind, könnte die Funktion des TLR4 z. B. in intestinalen Epithelzellen, besser erklären. Dabei wäre es interessant zu wissen, über welche Signalkaskaden Stimulus-abhängige Signale (z.B. LPS) übermittelt werden und zur Regulation der TLRs beitragen.

Divergenzen in den transienten Reporterassays des murinen *Tlr4* Promotors mit der *in vivo* Promotorstruktur liegt möglicherweise an der fehlenden Chromatineinbettung des *Tlr4* Gens. Mittels MNase Footprints der Promotorregion können Nukleosomen lokalisiert werden. Ein Vergleich der Nukleosomenpositionierung von myeloischen und nicht-myeloischen Zellen in der Maus könnten den Einfluss der Chromatinstruktur auf die Transkription von *Tlr4* zeigen.

Des Weiteren wurde das Vorhandensein von Enhancer-Elementen, die bis zu 100 kb weit vom proximalen Promotor entfernt liegen können oder in Introns vorkommen, bereits diskutiert. Das Auffinden solcher Enhancer- oder auch Silencer-Kontrollregionen könnte eine weitere Erklärung für unterschiedliche Regulationsmechanismen der TLRs in Mensch und Maus sein.

Die Analysen auf der Ebene der Transkription stellen wichtige Grundlagen für die nachfolgende Regulation der Proteinexpression dar. Deshalb ist es wichtig herauszufinden, ob die Unterschiede der regulatorischen Elemente von TLRs beider Spezies zu einer Spezies-spezifischen Immunantwort gegenüber TLR-Liganden führt, besonders im Hinblick darauf, dass die Maus ein etabliertes Modell für viele wissenschaftliche Untersuchungen ist.

7. Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind konservierte „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) der angeborenen Immunabwehr, die sich jedoch während der Evolution in ihren regulatorischen Bereichen zum Teil stark verändert haben. Dies hat zur Folge, dass sich verschiedene Spezies in der Expression der TLRs unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genpromotoren von *TLR4* sowie *TLR5* und *TLR9* in Mensch und Maus hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Expression auf Ebene der Transkription untersucht.

Die Expression von *TLR4* erfolgt in murinen und humanen Makrophagen ähnlich. *In vivo* Footprints zeigten, dass die gleichen Bindestellen, darunter mehrere PU.1-Motive, eine IRF/Ets-Bindestelle und eine AP-1/E-Box für die Transkription wichtig sind. Außerdem werden die gleichen Transkriptionsstarts (TSS) verwendet. Der für den humanen *TLR4* Promotor bereits publizierte Nachweis der essentiellen PU.1- und ICSBP-Bindung (EMSA, Reporteranalysen) konnte für den murinen *Tlr4* Promotor nur für den Transkriptionsfaktor PU.1 erbracht werden. Während eine starke PU.1 Bindung auch *in vivo* am murinen Promotor (ChIP Experimente) nachgewiesen wurde, konnte anhand von *Icsbp*-defizienten Makrophagen gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *Icsbp* nicht für die Expression von *Tlr4* nötig ist. Die konservierte, mit Footprints versehene AP1/E-Box war in beiden Spezies wichtig, wobei eine Bindung von AP1 ausgeschlossen wurde. Für die Transkription konnten E-Box-bindende Faktoren verantwortlich gemacht werden, darunter wurden in Makrophagen bisher Faktoren aus der USF-Familie identifiziert (ChIP, EMSA).

Bezüglich der Reporteranalysen muriner *Tlr4* Promotorkonstrukte, war für die Interpretation der transkriptionellen Regulation dieses Gens ein sehr wichtiges Ergebnis, dass transiente Transfektionen in Makrophagen nicht *in vivo* Ereignisse der *Tlr4* Transkription in Mausmakrophagen wiedergeben. Gründe dafür wurden in der Diskussion erörtert.

Durch TSS-Analysen unterschiedlicher Zelltypen mittels 5'-RLM-RACE-PCR wurde in beiden Spezies erstmals ein alternativer distaler Promotor in nicht-myeloischen Zellen, ungefähr 200 bp stromaufwärts vom proximalen myeloischen Promotor, definiert. Interessanterweise wird dieser in intestinalen Epithelzellen der Maus ausschließlich verwendet, während in entsprechenden

humanen Zellen beide Promotoren funktionell sind. Die bevorzugte Verwendung des proximalen Promotors in nicht-myeloischen Zellen wurde durch das Vorhandensein nicht-konservierter Elemente (GC-Box, INR-Motiv) erklärt die den proximalen humanen *TLR4* Promotor stabilisieren.

In nicht-myeloischen Zellen der Maus ist die AP1/E-Box für die Regulation des distalen Promotors das wichtigste Element. Im Gegensatz zur Besetzung dieses Motivs in Makrophagen mit USF-Faktoren wurde eine Bindung dieser Faktoren in nicht-myeloischen Zellen ausgeschlossen, dafür wurden aber Hinweise auf die Rekrutierung anderer E-Box-bindender Faktoren wie TFEB und TFE3 erbracht.

Zum ersten Mal konnte am Beispiel des murinen *Tlr4* Gens gezeigt werden, dass alleine der myeloische Transkriptionsfaktor PU.1, der eine Reihe typisch myeloischer Promotoren kontrolliert, in der Lage ist den Transkriptionsstart festzulegen. Mittels der konditionell PU.1-induzierbaren Vorläuferzelllinie PUER wurde unmittelbar nach PU.1-Aktivierung die Verschiebung des TSS vom distalen nicht-myeloischen Promotor hin zum proximalen myeloischen Promotor nachgewiesen. Parallel durchgeführte *Tlr4* mRNA Analysen weisen auf eine wesentlich geringere Transkriptionsrate des distalen im Vergleich zum proximalen Promotor hin.

Für die *TLR5* Gene wurde gezeigt, dass sich die Promotoren von Mensch und Maus stark unterscheiden. Bereits beschriebene deutliche Unterschiede der Spezies-spezifischen Expression von *TLR5* konnten jedoch nicht bestätigt werden und im Widerspruch zur Literatur wurde auch eine Expression in Mausmakrophagen nachgewiesen.

Trotz der beschriebenen Spezies-spezifischen Expression von *TLR9* sind die Promotoren von Mensch und Maus über weite Bereiche konserviert und weisen ähnliche regulatorische Elemente (PU.1, AP1, IRF/Ets) wie im *TLR4* Promotor auf. In dem Kollaborationsprojekt mit K. Schroder wurde durch die Untersuchung von Makrophagen aus Icsbp-defizienten Mäusen gezeigt, dass Icsbp ein unerlässlicher Transkriptionsfaktor für die basale und IFN γ -induzierte *Tlr9* Expression ist.

Neben der transkriptionellen Kontrolle weisen *upstream* ATGs in ungefähr 80% der TLR Gene auf eine zusätzliche translationale Kontrolle hin. Am Beispiel des *TLR4* Gens konnte gezeigt werden, dass zwei nicht-konservierte uATGs in der Maus zu einem starken Verlust der Reportergenexpression im Vergleich zum humanen Promotorkonstrukt führte.

8. Literaturverzeichnis

- Abreu,M.T., Arnold,E.T., Thomas,L.S., Gonsky,R., Zhou,Y., Hu,B., and Arditi,M.** (2002) TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **277**:20431-20437.
- Abreu,M.T., Vora,P., Faure,E., Thomas,L.S., Arnold,E.T., and Arditi,M.** (2001) Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* **167**:1609-1616.
- Akira,S., Takeda,K., and Kaisho,T.** (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* **2**:675-680.
- Anderson,K.L., Smith,K.A., Perkin,H., Hermanson,G., Anderson,C.G., Jolly,D.J., Maki,R.A., and Torbett,B.E.** (1999) PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood.* **94**:2310-2318.
- Anderson,K.V., Jurgens,G., and Nusslein-Volhard,C.** (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* **42**:779-789.
- Andreesen,R., Picht,J., and Lohr,G.W.** (1983) Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *J.Immunol.Methods.* **56**:295-304.
- Ausubel Frederick, M Brent R and Kingston RE.** *Current Protocols in Molecular Biology.* 2006. John Wiley & Sons, Inc.2000.
- Ayer,D.E., Kretzner,L., and Eisenman,R.N.** (1993) Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell.* **72**:211-222.
- Babik,J.M., Adams,E., Tone,Y., Fairchild,P.J., Tone,M., and Waldmann,H.** (1999) Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit. *J.Immunol.* **162**:4069-4078.
- Backhed,F. and Hornef,M.** (2003) Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? *Microbes.Infect.* **5**:951-959.
- Backhed,F., Rokbi,B., Torstensson,E., Zhao,Y., Nilsson,C., Seguin,D., Normark,S., Buchan,A.M., and Richter-Dahlfors,A.** (2003) Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J.Infect.Dis.* **187**:829-836.
- Banchereau,J. and Steinman,R.M.** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**:245-252.
- Beckmann,H., Su,L.K., and Kadesch,T.** (1990) TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev.* **4**:167-179.
- Berczi,I., Bertok,L., and Berezna,T.** (1966) Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can.J.Microbiol.* **12**:1070-1071.
- Beutler,B.** (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* **430**:257-263.
- Beutler,B., Hoebe,K., Du,X., and Ulevitch,R.J.** (2003) How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J.Leukoc.Biol.* **74**:479-485.
- Bihl,F., Salez,L., Beaubier,M., Torres,D., Lariviere,L., Laroche,L., Benedetto,A., Martel,D., Lapointe,J.M., Ryffel,B., and Malo,D.** (2003) Overexpression of Toll-like receptor 4 amplifies the host response to lipopolysaccharide and provides a survival advantage in transgenic mice. *J.Immunol.* **170**:6141-6150.
- Bocker,U., Yezersky,O., Feick,P., Manigold,T., Panja,A., Kalina,U., Herweck,F., Rossol,S., and Singer,M.V.** (2003) Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int.J.Colorectal Dis.* **18**:25-32.

- Boyd,K.E. and Farnham,P.J.** (1997) Myc versus USF: discrimination at the cad gene is determined by core promoter elements. *Mol.Cell Biol.* **17**:2529-2537.
- Buras,J.A., Reenstra,W.R., and Fenton,M.J.** (1995) NF beta A, a factor required for maximal interleukin-1 beta gene expression is identical to the ets family member PU.1. Evidence for structural alteration following LPS activation. *Mol.Immunol.* **32**:541-554.
- Cario,E., Rosenberg,I.M., Brandwein,S.L., Beck,P.L., Reinecker,H.C., and Podolsky,D.K.** (2000) Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J.Immunol.* **164**:966-972.
- Carr,C.S. and Sharp,P.A.** (1990) A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol.Cell Biol.* **10**:4384-4388.
- Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Alebardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M.** (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat.Med.* **5**:919-923.
- Chen,H., Ray-Gallet,D., Zhang,P., Hetherington,C.J., Gonzalez,D.A., Zhang,D.E., Moreau-Gachelin,F., and Tenen,D.G.** (1995) PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene.* **11**:1549-1560.
- Child,S.J., Miller,M.K., and Geballe,A.P.** (1999) Translational control by an upstream open reading frame in the HER-2/neu transcript. *J.Biol.Chem.* **274**:24335-24341.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.
- Colonna,M.** (2007) TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur.J.Immunol.* **37**:306-309.
- Crepieux,P., Coll,J., and Stehelin,D.** (1994) The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev.Oncog.* **5**:615-638.
- Dabbagh,K. and Lewis,D.B.** (2003) Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr.Opin.Infect.Dis.* **16**:199-204.
- Dang,W., Sun,X.H., and Sen,R.** (1998) ETS-mediated cooperation between basic helix-loop-helix motifs of the immunoglobulin mu heavy-chain gene enhancer. *Mol.Cell Biol.* **18**:1477-1488.
- DeKoter,R.P., Walsh,J.C., and Singh,H.** (1998) PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* **17**:4456-4468.
- Egan,B.S., Lane,K.B., and Shepherd,V.L.** (1999) PU.1 and USF are required for macrophage-specific mannose receptor promoter activity. *J.Biol.Chem.* **274**:9098-9107.
- Eisenbeis,C.F., Singh,H., and Storb,U.** (1995) Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev.* **9**:1377-1387.
- Eklund,E.A., Jalava,A., and Kakar,R.** (1998) PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J.Biol.Chem.* **273**:13957-13965.
- Fan,J., Kapus,A., Marsden,P.A., Li,Y.H., Oreopoulos,G., Marshall,J.C., Frantz,S., Kelly,R.A., Medzhitov,R., and Rotstein,O.D.** (2002) Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. *J.Immunol.* **168**:5252-5259.
- Feinman,R., Qiu,W.Q., Pearse,R.N., Nikolajczyk,B.S., Sen,R., Sheffery,M., and Ravetch,J.V.** (1994) PU.1 and an HLH family member contribute to the myeloid-specific transcription of the Fc gamma RIIA promoter. *EMBO J.* **13**:3852-3860.
- Fischle,W., Wang,Y., Jacobs,S.A., Kim,Y., Allis,C.D., and Khorasanizadeh,S.** (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* **17**:1870-1881.
- Fisher,R.C. and Scott,E.W.** (1998) Role of PU.1 in hematopoiesis. *Stem Cells.* **16**:25-37.
- Garnier,G., Circolo,A., and Colten,H.R.** (1995) Translational regulation of murine complement factor B alternative transcripts by upstream AUG codons. *J.Immunol.* **154**:3275-3282.

- Gewirtz,A.T., Navas,T.A., Lyons,S., Godowski,P.J., and Madara,J.L.** (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J.Immunol.* **167**:1882-1885.
- Gottschalk,L.R., Giannola,D.M., and Emerson,S.G.** (1993) Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J.Exp.Med.* **178**:1681-1692.
- Graw,R.G., Jr., Herzig,G.P., Eisel,R.J., and Perry,S.** (1971) Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion.* **11**:94-101.
- Gregor,P.D., Sawadogo,M., and Roeder,R.G.** (1990) The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* **4**:1730-1740.
- Guo,Z., Garg,S., Hill,K.M., Jayashankar,L., Mooney,M.R., Hoelscher,M., Katz,J.M., Boss,J.M., and Sambhara,S.** (2005) A distal regulatory region is required for constitutive and IFN-beta-induced expression of murine TLR9 gene. *J.Immunol.* **175**:7407-7418.
- Haehnel,V., Schwarzfischer,L., Fenton,M.J., and Rehli,M.** (2002) Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J.Immunol.* **168**:5629-5637.
- Hagemeier,C., Bannister,A.J., Cook,A., and Kouzarides,T.** (1993) The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:1580-1584.
- Hähnel, Viola.** Die transkriptionelle Regulation der Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR3 und TLR4) in mononukleären Phagozyten. 2003.
- Hausmann,M., Kiessling,S., Mestermann,S., Webb,G., Spottl,T., Andus,T., Scholmerich,J., Herfarth,H., Ray,K., Falk,W., and Rogler,G.** (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**:1987-2000.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A.** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* **410**:1099-1103.
- Heinz,S., Haehnel,V., Karaghiosoff,M., Schwarzfischer,L., Muller,M., Krause,S.W., and Rehli,M.** (2003) Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J.Biol.Chem.* **278**:21502-21509.
- Hemmi,H., Kaisho,T., Takeda,K., and Akira,S.** (2003) The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J.Immunol.* **170**:3059-3064.
- Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S.** (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**:740-745.
- Hershey,C.L. and Fisher,D.E.** (2004) Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone.* **34**:689-696.
- Himmelmann,A., Riva,A., Wilson,G.L., Lucas,B.P., Thevenin,C., and Kehrl,J.H.** (1997) PU.1/Pip and basic helix loop helix zipper transcription factors interact with binding sites in the CD20 promoter to help confer lineage- and stage-specific expression of CD20 in B lymphocytes. *Blood.* **90**:3984-3995.
- Hohaus,S., Petrovick,M.S., Voso,M.T., Sun,Z., Zhang,D.E., and Tenen,D.G.** (1995) PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol.Cell Biol.* **15**:5830-5845.
- Holtschke,T., Lohler,J., Kanno,Y., Fehr,T., Giese,N., Rosenbauer,F., Lou,J., Knobloch,K.P., Gabriele,L., Waring,J.F., Bachmann,M.F., Zinkernagel,R.M., Morse,H.C., III, Ozato,K., and Horak,I.** (1996) Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell.* **87**:307-317.
- Honda,K. and Taniguchi,T.** (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat.Rev.Immunol.* **6**:644-658.

- Hornef,M.W., Frisan,T., Vandewalle,A., Normark,S., and Richter-Dahlfors,A.** (2002) Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J.Exp.Med.* **195**:559-570.
- Hornung,V., Rothenfusser,S., Britsch,S., Krug,A., Jahrsdorfer,B., Giese,T., Endres,S., and Hartmann,G.** (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* **168**:4531-4537.
- Huan,C., Sashital,D., Hailemariam,T., Kelly,M.L., and Roman,C.A.** (2005) Renal carcinoma-associated transcription factors TFE3 and TFEB are leukemia inhibitory factor-responsive transcription activators of E-cadherin. *J.Biol.Chem.* **280**:30225-30235.
- Iwami,K.I., Matsuguchi,T., Masuda,A., Kikuchi,T., Musikacharoen,T., and Yoshikai,Y.** (2000) Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J.Immunol.* **165**:6682-6686.
- Iwasaki,A. and Medzhitov,R.** (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* **5**:987-995.
- Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R.** (2002) Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* **20**:197-216. Epub;2001 Oct 4.:197-216.
- Janknecht,R. and Hunter,T.** (1996) Transcription. A growing coactivator network. *Nature.* **383**:22-23.
- Johnson,W.D., Jr., Mei,B., and Cohn,Z.A.** (1977) The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *J.Exp.Med.* **146**:1613-1626.
- Jonsen,M.D., Petersen,J.M., Xu,Q.P., and Graves,B.J.** (1996) Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in Ets-1. *Mol.Cell Biol.* **16**:2065-2073.
- Kalis,C., Kanzler,B., Lembo,A., Poltorak,A., Galanos,C., and Freudenberg,M.A.** (2003) Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur.J.Immunol.* **33**:798-805.
- Kawai,T. and Akira,S.** (2006) TLR signaling. *Cell Death.Differ.* **13**:816-825.
- Kawai,T. and Akira,S.** (2007) TLR signaling. *Semin.Immunol.* **19**:24-32.
- Kiessling,S., Muller-Newen,G., Leeb,S.N., Hausmann,M., Rath,H.C., Strater,J., Spottl,T., Schlottmann,K., Grossmann,J., Montero-Julian,F.A., Scholmerich,J., Andus,T., Buschauer,A., Heinrich,P.C., and Rogler,G.** (2004) Functional expression of the interleukin-11 receptor alpha-chain and evidence of antiapoptotic effects in human colonic epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **279**:10304-10315.
- Kodandapani,R., Pio,F., Ni,C.Z., Piccialli,G., Klemsz,M., McKercher,S., Maki,R.A., and Ely,K.R.** (1996) A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature.* **380**:456-460.
- Kozak,M.** (1987a) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**:8125-8148.
- Kozak,M.** (1987b) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J.Mol.Biol.* **20**:196:947-950.
- Kozak,M.** (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J.Cell Biol.* **115**:887-903.
- Kreider,B.L., Benezra,R., Rovera,G., and Kadesch,T.** (1992) Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science.* **255**:1700-1702.
- Krug,A., Towarowski,A., Britsch,S., Rothenfusser,S., Hornung,V., Bals,R., Giese,T., Engelmann,H., Endres,S., Krieg,A.M., and Hartmann,G.** (2001) Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur.J.Immunol.* **31**:3026-3037.
- Krylov,D., Kasai,K., Echlin,D.R., Taparowsky,E.J., Arnheiter,H., and Vinson,C.** (1997) A general method to design dominant negatives to B-HLHZip proteins that abolish DNA binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:12274-12279.

- Krysinska,H., Hoogenkamp,M., Ingram,R., Wilson,N., Tagoh,H., Laslo,P., Singh,H., and Bonifer,C.** (2007) A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene. *Mol.Cell Biol.* **27**:878-887.
- Lehnardt,S., Lachance,C., Patrizi,S., Lefebvre,S., Follett,P.L., Jensen,F.E., Rosenberg,P.A., Volpe,J.J., and Vartanian,T.** (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J.Neurosci.* **22**:2478-2486.
- Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **86**:973-983.
- Li,R., Pei,H., and Watson,D.K.** (2000) Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene.* **19**:6514-6523.
- Liu,Y. and Janeway,C.A., Jr.** (1992) Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**:3845-3849.
- Lomvardas,S. and Thanos,D.** (2002) Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell.* **110**:261-271.
- Lotz,M., Gutle,D., Walther,S., Menard,S., Bogdan,C., and Hornef,M.W.** (2006) Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J.Exp.Med.* **203**:973-984.
- Maaser,C., Heidemann,J., von Eiff,C., Lugerling,A., Spahn,T.W., Binion,D.G., Domschke,W., Lugerling,N., and Kucharzik,T.** (2004) Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J.Immunol.* **172**:5056-5062.
- Marecki,S., Atchison,M.L., and Fenton,M.J.** (1999) Differential expression and distinct functions of IFN regulatory factor 4 and IFN consensus sequence binding protein in macrophages. *J.Immunol.* **163**:2713-2722.
- Matsuguchi,T., Musikachoen,T., Ogawa,T., and Yoshikai,Y.** (2000a) Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J.Immunol.* **165**:5767-5772.
- Matsuguchi,T., Takagi,K., Musikachoen,T., and Yoshikai,Y.** (2000b) Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood.* **95**:1378-1385.
- Mattei,F., Schiavoni,G., Borghi,P., Venditti,M., Canini,I., Sestili,P., Pietraforte,I., Morse,H.C., III, Ramoni,C., Belardelli,F., and Gabriele,L.** (2006) ICSBP/IRF-8 differentially regulates antigen uptake during dendritic-cell development and affects antigen presentation to CD4+ T cells. *Blood.* **108**:609-617.
- McKercher,S.R., Torbett,B.E., Anderson,K.L., Henkel,G.W., Vestal,D.J., Baribault,H., Klemsz,M., Feeney,A.J., Wu,G.E., Paige,C.J., and Maki,R.A.** (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15**:5647-5658.
- Means,T.K., Hayashi,F., Smith,K.D., Aderem,A., and Luster,A.D.** (2003) The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J.Immunol.* **170**:5165-5175.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr.** (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**:394-397.
- Mehta,A., Trotta,C.R., and Peltz,S.W.** (2006) Derepression of the Her-2 uORF is mediated by a novel post-transcriptional control mechanism in cancer cells. *Genes Dev.* **20**:939-953.
- Meylan,E. and Tschopp,J.** (2006) Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol.Cell.* **22**:561-569.
- Morris,D.R. and Geballe,A.P.** (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol.Cell Biol.* **20**:8635-8642.
- Mueller,T., Terada,T., Rosenberg,I.M., Shibolet,O., and Podolsky,D.K.** (2006) Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. *J.Immunol.* **176**:5805-5814.

- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H.** (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. **24:17-27**.:17-27.
- Musikacharoen,T., Matsuguchi,T., Kikuchi,T., and Yoshikai,Y.** (2001) NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J.Immunol.* **166**:4516-4524.
- Muzio,M., Bosisio,D., Polentarutti,N., D'amico,G., Stoppacciaro,A., Mancinelli,R., van't Veer,C., Penton-Rol,G., Ruco,L.P., Allavena,P., and Mantovani,A.** (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J.Immunol.* **164**:5998-6004.
- Muzio,M., Natoli,G., Saccani,S., Levrero,M., and Mantovani,A.** (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J.Exp.Med.* **187**:2097-2101.
- Nelson,N., Marks,M.S., Driggers,P.H., and Ozato,K.** (1993) Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol.Cell Biol.* **13**:588-599.
- Ng,H.H., Robert,F., Young,R.A., and Struhl,K.** (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol.Cell.* **11**:709-719.
- Nhu,Q.M., Cuesta,N., and Vogel,S.N.** (2006) Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2). *J.Endotoxin.Res.* **12**:285-295.
- Nomura,F., Akashi,S., Sakao,Y., Sato,S., Kawai,T., Matsumoto,M., Nakanishi,K., Kimoto,M., Miyake,K., Takeda,K., and Akira,S.** (2000) Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J.Immunol.* **164**:3476-3479.
- Osborn,L., Kunkel,S., and Nabel,G.J.** (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**:2336-2340.
- Otte,J.M., Cario,E., and Podolsky,D.K.** (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **126**:1054-1070.
- Pabo,C.O. and Sauer,R.T.** (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu.Rev.Biochem.* **61**:1053-95.:1053-1095.
- Pahl,H.L., Rosmarin,A.G., and Tenen,D.G.** (1992) Characterization of the myeloid-specific CD11b promoter. *Blood.* **79**:865-870.
- Pasare,C. and Medzhitov,R.** (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* **299**:1033-1036.
- Perkel,J.M. and Atchison,M.L.** (1998) A two-step mechanism for recruitment of Pip by PU.1. *J.Immunol.* **160**:241-252.
- Politis,A.D., Sivo,J., Driggers,P.H., Ozato,K., and Vogel,S.N.** (1992) Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine peritoneal macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone, and protein kinase inhibitors. *J.Immunol.* **148**:801-807.
- Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., and Beutler,B.** (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* **282**:2085-2088.
- Qureshi,S.T., Lariviere,L., Leveque,G., Clermont,S., Moore,K.J., Gros,P., and Malo,D.** (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J.Exp.Med.* **189**:615-625.
- Rakoff-Nahoum,S., Paglino,J., Eslami-Varzaneh,F., Edberg,S., and Medzhitov,R.** (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* **118**:229-241.

- Rehli,M.** (2002) Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.* **23**:375-378.
- Rehli,M., Poltorak,A., Schwarzfischer,L., Krause,S.W., Andreesen,R., and Beutler,B.** (2000) PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J.Biol.Chem.* **275**:9773-9781.
- Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F.** (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:588-593.
- Roeder,R.G.** (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* **579**:909-915.
- Roger,T., David,J., Glauser,M.P., and Calandra,T.** (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* **414**:920-924.
- Roger,T., Miconnet,I., Schiesser,A.L., Kai,H., Miyake,K., and Calandra,T.** (2005) Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (Tlr4) gene expression. *Biochem.J.* **387**:355-365.
- Rosenbauer,F., Waring,J.F., Foerster,J., Wietstruk,M., Philipp,D., and Horak,I.** (1999) Interferon consensus sequence binding protein and interferon regulatory factor-4/Pip form a complex that represses the expression of the interferon-stimulated gene-15 in macrophages. *Blood.* **94**:4274-4281.
- Ross,I.L., Yue,X., Ostrowski,M.C., and Hume,D.A.** (1998) Interaction between PU.1 and another Ets family transcription factor promotes macrophage-specific Basal transcription initiation. *J.Biol.Chem.* **273**:6662-6669.
- Roy,A.L., Malik,S., Meisterernst,M., and Roeder,R.G.** (1993) An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* **365**:355-359.
- Roy,A.L., Meisterernst,M., Pognonec,P., and Roeder,R.G.** (1991) Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* **354**:245-248.
- Roy,M.F., Lariviere,L., Wilkinson,R., Tam,M., Stevenson,M.M., and Malo,D.** (2006) Incremental expression of Tlr4 correlates with mouse resistance to *Salmonella* infection and fine regulation of relevant immune genes. *Genes Immun.* **7**:372-383.
- Sachs,M.S. and Geballe,A.P.** (2006) Downstream control of upstream open reading frames. *Genes Dev.* **20**:915-921.
- Sambrook,J.a.R.DW.** (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson,R.J., Shepperdson,R.T., Vatter,A.E., and Talmage,D.W.** (1977) Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J.Immunol.* **118**:1409-1414.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bannister,A.J., Sherriff,J., Bernstein,B.E., Emre,N.C., Schreiber,S.L., Mellor,J., and Kouzarides,T.** (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* **419**:407-411.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bernstein,B.E., Karabetsou,N., Morillon,A., Weise,C., Schreiber,S.L., Mellor,J., and Kouzarides,T.** (2003) Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol.Cell.* **12**:1325-1332.
- Schroder,K., Hertzog,P.J., Ravasi,T., and Hume,D.A.** (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.* **75**:163-189.
- Schroder,K., Lichtinger,M., Irvine,K.M., Brion,K., Trieu,A., Ross,I.L., Ravasi,T., Stacey,K.J., Rehli,M., Hume,D.A., and Sweet,M.J.** (2007) PU.1 and ICSBP control constitutive and IFN-gamma-regulated Tlr9 gene expression in mouse macrophages. *J.Leukoc.Biol.* **81**:1577-1590.
- Schroder,K., Sweet,M.J., and Hume,D.A.** (2006) Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology.* **211**:511-524.
- Schumacher,M.A., Lau,A.O., and Johnson,P.J.** (2003) Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote. *Cell.* **115**:413-424.

- Schumann,R.R., Leong,S.R., Flaggs,G.W., Gray,P.W., Wright,S.D., Mathison,J.C., Tobias,P.S., and Ulevitch,R.J.** (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. **249**:1429-1431.
- Scott,E.W., Simon,M.C., Anastasi,J., and Singh,H.** (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. **265**:1573-1577.
- Sester,D.P., Trieu,A., Brion,K., Schroder,K., Ravasi,T., Robinson,J.A., McDonald,R.C., Ripoll,V., Wells,C.A., Suzuki,H., Hayashizaki,Y., Stacey,K.J., Hume,D.A., and Sweet,M.J.** (2005) LPS regulates a set of genes in primary murine macrophages by antagonising CSF-1 action. *Immunobiology*. **210**:97-107.
- Sharf,R., Azriel,A., Lejbkowitz,F., Winograd,S.S., Ehrlich,R., and Levi,B.Z.** (1995) Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors. *J.Biol.Chem.* **270**:13063-13069.
- Sharf,R., Meraro,D., Azriel,A., Thornton,A.M., Ozato,K., Petricoin,E.F., Lerner,A.C., Schaper,F., Hauser,H., and Levi,B.Z.** (1997) Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J.Biol.Chem.* **272**:9785-9792.
- Sharrocks,A.D., Brown,A.L., Ling,Y., and Yates,P.R.** (1997) The ETS-domain transcription factor family. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **29**:1371-1387.
- Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., and Kimoto,M.** (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* **189**:1777-1782.
- Sieweke,M.H., Tekotte,H., Jarosch,U., and Graf,T.** (1998) Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.* **17**:1728-1739.
- Staege,H., Schaffner,A., and Schneemann,M.** (2000) Human toll-like receptors 2 and 4 are targets for deactivation of mononuclear phagocytes by interleukin-4. *Immunol.Lett.* **71**:1-3.
- Sweet,M.J., Stacey,K.J., Kakuda,D.K., Markovich,D., and Hume,D.A.** (1998) IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J.Interferon Cytokine Res.* **18**:263-271.
- Tagoh,H., Cockerill,P.N., and Bonifer,C.** (2006) In vivo genomic footprinting using LM-PCR methods. *Methods Mol.Biol.* **325**:285-314.
- Takeshita,F., Suzuki,K., Sasaki,S., Ishii,N., Klinman,D.M., and Ishii,K.J.** (2004) Transcriptional regulation of the human TLR9 gene. *J.Immunol.* **173**:2552-2561.
- Tamura,T., Nagamura-Inoue,T., Shmeltzer,Z., Kuwata,T., and Ozato,K.** (2000) ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity*. **13**:155-165.
- Tamura,T., Thotakura,P., Tanaka,T.S., Ko,M.S., and Ozato,K.** (2005) Identification of target genes and a unique cis element regulated by IRF-8 in developing macrophages. *Blood*. **106**:1938-1947.
- Tian,G., Erman,B., Ishii,H., Gangopadhyay,S.S., and Sen,R.** (1999) Transcriptional activation by ETS and leucine zipper-containing basic helix-loop-helix proteins. *Mol.Cell Biol.* **19**:2946-2957.
- Tsatsanis,C., Androulidaki,A., Alissafi,T., Charalampopoulos,I., Dermitzaki,E., Roger,T., Gravanis,A., and Margioris,A.N.** (2006) Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J.Immunol.* **176**:1869-1877.
- Tsujimura,H., Nagamura-Inoue,T., Tamura,T., and Ozato,K.** (2002) IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor-8 guides bone marrow progenitor cells toward the macrophage lineage. *J.Immunol.* **169**:1261-1269.
- Tsujimura,H., Tamura,T., and Ozato,K.** (2003) Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J.Immunol.* **170**:1131-1135.
- Uchida,T., Scumpia,P.O., Murasko,D.M., Seki,S., Woulfe,S., Clare-Salzler,M.J., and Moldawer,L.L.** (2007) Variable requirement of dendritic cells for recruitment of NK and T cells to different TLR agonists. *J.Immunol.* **178**:3886-3892.

- Uematsu,S. and Akira,S.** (2007) Toll-like receptors and Type I interferons. *J.Biol.Chem.* **282**:15319-15323.
- Uematsu,S., Jang,M.H., Chevrier,N., Guo,Z., Kumagai,Y., Yamamoto,M., Kato,H., Sougawa,N., Matsui,H., Kuwata,H., Hemmi,H., Coban,C., Kawai,T., Ishii,K.J., Takeuchi,O., Miyasaka,M., Takeda,K., and Akira,S.** (2006) Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat.Immunol.* **7**:868-874.
- Underhill,D.M.** (2003) Toll-like receptors: networking for success. *Eur.J.Immunol.* **33**:1767-1775.
- Van Uden,J.H., Tran,C.H., Carson,D.A., and Raz,E.** (2001) Type I interferon is required to mount an adaptive response to immunostimulatory DNA. *Eur.J.Immunol.* **31**:3281-3290.
- Viollet,B., Lefrancois-Martinez,A.M., Henrion,A., Kahn,A., Raymondjean,M., and Martinez,A.** (1996) Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J.Biol.Chem.* **271**:1405-1415.
- Visintin,A., Mazzoni,A., Spitzer,J.H., Wyllie,D.H., Dower,S.K., and Segal,D.M.** (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J.Immunol.* **166**:249-255.
- Wagner,H.** (2002) Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Microbiol.* **5**:62-69.
- Walsh,J.C., DeKoter,R.P., Lee,H.J., Smith,E.D., Lancki,D.W., Gurish,M.F., Friend,D.S., Stevens,R.L., Anastasi,J., and Singh,H.** (2002) Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity.* **17**:665-676.
- Wang,C.Y., Bassuk,A.G., Boise,L.H., Thompson,C.B., Bravo,R., and Leiden,J.M.** (1994) Activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. *Mol.Cell Biol.* **14**:1153-1159.
- Wasylyk,B., Hahn,S.L., and Giovane,A.** (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur.J.Biochem.* **211**:7-18.
- Weisz,A., Marx,P., Sharf,R., Appella,E., Driggers,P.H., Ozato,K., and Levi,B.Z.** (1992) Human interferon consensus sequence binding protein is a negative regulator of enhancer elements common to interferon-inducible genes. *J.Biol.Chem.* **267**:25589-25596.
- Wright,S.D., Ramos,R.A., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., and Mathison,J.C.** (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249**:1431-1433.
- Xiong,H., Zhu,C., Li,H., Chen,F., Mayer,L., Ozato,K., Unkeless,J.C., and Plevy,S.E.** (2003) Complex formation of the interferon (IFN) consensus sequence-binding protein with IRF-1 is essential for murine macrophage IFN-gamma-induced iNOS gene expression. *J.Biol.Chem.* **278**:2271-2277.
- Xu,H., Kramer,M., Spengler,H.P., and Peters,J.H.** (1995) Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN-gamma exhibit phenotype and function of blood dendritic cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* **378**:75-8.:75-78.
- Yamagata,T., Nishida,J., Tanaka,S., Sakai,R., Mitani,K., Yoshida,M., Taniguchi,T., Yazaki,Y., and Hirai,H.** (1996) A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Mol.Cell Biol.* **16**:1283-1294.
- Yamamoto,H., Kihara-Negishi,F., Yamada,T., Hashimoto,Y., and Oikawa,T.** (1999) Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene.* **18**:1495-1501.
- Yi,A.K., Klinman,D.M., Martin,T.L., Matson,S., and Krieg,A.M.** (1996) Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J.Immunol.* **157**:5394-5402.
- Yordy,J.S. and Muise-Helmericks,R.C.** (2000) Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene.* **19**:6503-6513.
- Zarembek,K.A. and Godowski,P.J.** (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J.Immunol.* **168**:554-561.

Zhang,D., Zhang,G., Hayden,M.S., Greenblatt,M.B., Bussey,C., Flavell,R.A., and Ghosh,S. (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. **303**:1522-1526.

Zhang,D.E., Hetherington,C.J., Chen,H.M., and Tenen,D.G. (1994) The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol.Cell Biol.* **14**:373-381.

9. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AP1	„Activator Protein“
APC	„Antigen Presenting Cell“
APS	Ammoniumpersulfat
bHLH	„basic Helix-Loop-Helix“
BMM	Knochenmarkmakrophagen
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	„Caspase Recruitment Domain“
cDNA	„copy DNA“
CDP	„CCAAT Displacement Protein“
ChIP	Chromosomenimmunpräzipitation
CREB	„cAMP Response Element (CRE)- Binding Protein“
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	„Electromobility Shift Assay“
EtBr	Ethidiumbromid
Ets	„E26 transformation specific“
FCS	Fötales Kälberserum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
Hifi	„High fidelity“
I κ B	„Inhibitor of NF- κ B“
ICSBP	„Interferon Consensus Sequence Binding Protein“
IEC	intestinale Epithelzellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
INR	Initiator-like Element
IRAK	„IL1-R Associated Kinase“
IRF	„Interferon Regulatory Factor“
K.o.	„Knock-out“
LB	Luria Bertani
LBP	„LPS Binding Protein“
LM-PCR	„Ligation-mediated PCR“
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	„Leucine Rich Repeat“
MAPK	„Mitogen-Activated Protein Kinase“
MBL	„Mannan-Binding-Lectin“
M-CSF	„Macrophage-Colony Stimulating Factor“
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
MNC	mononukleäre Zellen
Mo	Monozyten
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
MyD88	„Myeloid-Differentiation Primary-Response Protein 88“
NF- κ B	„Nuclear Factor- κ B“
NF-Y	„Nuclear Factor Y“
Oct	Octamer
OD	Optische Dichte
OHT	Tamoxifen
PAMP	„Pathogen-Associated Molecular Pattern“
PBLs	„Peripheral Blood Leukocytes“
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytische dendritische Zelle
PIP	„PU.1 Interaction Partner“
PMSF	Phenylmethylsulfonsäure
PRR	„Pattern Recognition Receptor“
RLM-RACE	„RNA Ligation-Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends“
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
SD	„Standard Deviation“
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SS	Supershift
SSp	Salmon Sperm
STAT	„Signal Transducers and Activators of Transcription“
TAE	Tris-Acetate/EDTA Electrophoresis Buffer
TBP	„TATA-Binding Protein“
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TGE	Tris-Glycine/EDTA
TIR	Toll-IL-1Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	„Tumor Necrosis Factor“
TRAF	„TNF-Receptor Associated Factor“
TSS	Transkriptionsstart
U	„Units“
UPM	Umdrehungen pro Minute
USF	„Upstream Stimulatory Factor“
UTR	„Untranslated Region“
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
Wt	Wildtyp

Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und für die großzügige Unterstützung während dieser Zeit möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Reinhard Andreesen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis danke ich sehr für die Bereitschaft der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit und für sein Engagement schon während des Studiums. Durch ihn bin ich erst zu dieser netten Arbeitsgruppe gekommen!

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer PD Dr. Michael Rehli für seine außerordentliche Betreuung während all der Jahre und sein großes Interesse und endlose Geduld, insbesondere in der Endphase! Vor allem möchte ich ihm für meinen Leeds-Aufenthalt und die Teilnahme an mehreren internationalen Kongressen danken. Ich habe wirklich sehr viel dazugelernt!

Mein Dank geht an Prof. Dr. Constanze Bonifer für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor in Leeds. Dr. Richard Ingram danke ich für die nette, intensive Einführung in die Welt des Footprintings und Claire Lacroix und Svitlana Melnik für ihre Freundschaft auch außerhalb des Labors!

Herzlichst möchte ich Mathias Hornef für seine hervorragenden Präparationen von IECs danken und mein Dank gilt Daniela Vogl für ihre große Hilfsbereitschaft bei meinen ersten Versuchen IECs selber zu präparieren.

Schon in alle Winde verweht, geht mein Dank trotzdem an meinen ChIP-Master Dr. Sven Heinz, Dr. Viola Hähnel und PhD Krishna Mondal für die Horror-Abende, Dr. Achim Ehrnsperger für die morgendlichen Diskussionen, Dr. Katharina Brandl für die sonntäglichen Winzerrunden, Dr. Cindy Swett für die gute Laune und Fußballer Dr. Peter Walbrun.

Ein herzliches Dankeschön an alle im Forschungsbau H1 und allen Forschern drumherum, die ich nicht alle aufzählen kann, für den schönen Laboralltag! Erwähnen möchte ich auch die Laufgruppe, die lange Zeit meine dienstäglichen Abende nach dem Labor ausfüllte!

Danke an meine Labornachbarn PhD Hang ThuPham for your help and talks und Alice Peuker, Dr. Eva Gottfried, Alexandra Müller und Michael Kastenberger, für die angenehme Atmosphäre. Prof. Marina Kreutz für die Laborausflüge, Eddy Schilling für die Kaffeepausen, Maja Klug die süße Biene☺, Lucia Schwarzfischer-Pfeilschifter (deine Ordnung hätt' ich gern!) und Sabine Pape für Eure freundschaftliche Hilfe. Tobias Weil danke ich für seinen unverbesserlichen Optimismus, Katrin Dietl und Dr. Mike Aigner für seine Tipps beim Kampf mit den Abbildungen.

Besonders danke ich Claudia Gebhard - „Schatzi“, da macht sogar Krankengymnastik Spaß und Silke Wiedmann, die stets für positive Ablenkung sorgte und für alles zu haben ist! Ganz besonders danke ich meinem großen „Schätzchen“ Dr. Carol El Chartouni, die gar nicht weiss wieviel Geduld sie hat und in allen Lebenslagen eine gute Freundin ist.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie. Meiner Oma, die immer die Daumen gedrückt hat und meinen beiden Brüdern Michael und Bernhard. Ganz besonders aber möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich bis hierher immer bestens unterstützt haben und immer für mich da sind!

Publikationsliste

Lichtinger M., Ingram R., Hornef M.W., Bonifer C., Rehli M.

Transcription factor PU.1 controls transcription start site positioning and alternative TLR4 promotor usage.

(J Biol Chem. 2007, im Druck)

Pham T.H., Langmann S., Schwarzfischer L., El Chartouni C., Lichtinger M., Klug M., Krause S.W., Rehli M.

CCAAT Enhancer-binding Protein beta Regulates Constitutive Gene Expression during Late Stages of Monocyte to Macrophage Differentiation.

(J Biol Chem. 2007, Jul 27;282:21924-21933)

Schroder K., Lichtinger M., Irvine K.M., Brion K., Trieu A., Ross I.L., Ravasi T., Stacey K.J., Rehli M., Hume D.A., Sweet M.J.

PU.1 and ICSBP control constitutive and IFN-gamma-regulated Tlr9 gene expression in mouse macrophages.

(J Leukoc Biol. 2007, Jun;81:1577-1590)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Monika Lichtinger)